



(51) 国際特許分類 C12N 15/56, 9/24, C12P 19/00		A1	(11) 国際公開番号 WO00/18931
			(43) 国際公開日 2000年4月6日 (06.04.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05346		(22) 国際出願日 1999年9月29日 (29.09.99)	
(30) 優先権データ 特願平10/294675 1998年9月30日 (30.09.98)		JP	(74) 代理人 弁理士 萩野 平, 外(HAGINO, Taira et al.) 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo, (JP)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 天野製薬株式会社 (AMANO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒460-0003 愛知県名古屋市中区錦一丁目2番7号 Aichi, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)	
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 山本 繁(YAMAMOTO, Shigeru)(JP/JP) 岡田正通(OKADA, Masamichi)(JP/JP) 〒460-0003 愛知県名古屋市中区錦一丁目2番7号 天野製薬株式会社内 Aichi, (JP) 確米薬市(USUI, Taichi)(JP/JP) 〒422-8017 静岡県静岡市大谷836 静岡大学 農学部内 Shizuoka, (JP) 坂田完三(SAKATA, Kanzo)(JP/JP) 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄官有地 京都大学 化学研究所内 Kyoto, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: NOVEL ENZYME COMPOSITIONS, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND UTILIZATION OF THE SAME			
(54) 発明の名称 新規な酵素組成物、その製造法及び用途			
(57) Abstract A novel enzyme with a microbial origin which has an activity of cleaving disaccharide glycosides (in particular $\beta$ -primeveroside and/or disaccharide glycosides similar thereto) in disaccharide units; and a gene encoding this enzyme. Various components can be produced by treating disaccharide glycosides or modified glycosides with this enzyme.			

(57)要約

二糖配糖体（特に、 $\beta$ -プリメベロシド及び／又は類似する二糖配糖体）を二糖単位で切断する活性を有する新規な微生物由来の酵素、該酵素の製造方法、該酵素をコードする遺伝子、及び該酵素の用途。該酵素を二糖配糖体や修飾配糖体に作用させることにより各種成分を生成することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロベニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

## 新規な酵素組成物、その製造法及び用途

## 技術分野

本発明は、二糖配糖体、特に $\beta$ -プリメベロシド及び／又はその類似体、を二糖単位で切断する作用を有する酵素活性を含有する微生物由来の新規な酵素、当該酵素の製造方法、当該酵素をコードする遺伝子、当該遺伝子を含有するベクター、当該ベクターを導入した形質転換体、並びに当該酵素を用いた用途に関する。

## 背景技術

植物の香気成分であるゲラニオール、リナロール、ベンジルアルコール、2-フェニルアルコールや $C_{13}$ -ノルテルペノイドアルコールなどのアルコール系香気は花、茶、果物、ワインなどの香気生成に重要な働きをなしている。

これらの香気成分のなかで、ベンジルアルコールや(Z)-3-ヘキセノールの香気前駆体としては $\beta$ -D-グルコピラノシド等の単糖配糖体が単離同定されている。

最近になって、花のような香気について重要な働きを果たすと考えられる、ゲラニオールやリナロール等のアルコール系香気前駆体として二糖配糖体の $\beta$ -プリメベロシド( $\beta$ -primeveroside、6-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside)あるいはその類似体の存在が確認された。また、その他の前述した他のアルコール系香気成分の前駆体としても二糖配糖体の $\beta$ -プリメベロシドとその類似体の存在が明らかになってきている。

さらに香気以外にも色素、薬理成分など生理活性物質の一部においても二糖配糖体 $\beta$ -プリメベロシドあるいはその類似体として存在していることが明らかになってきている。例えばソテツなどのマクロザミンは $\beta$ -プリメベロシダーゼによって二糖単位で切断され毒素が生成することが知られている。

一方、これらの香気成分や生理活性成分の前駆体に作用して二糖単位で切断す

る作用を有する酵素は茶葉などよりわずかに確認されているのみであり（特開平8-140675）、その利用に関してはほとんど研究されていない状況であった。最近になってからこれら二糖配糖体並びのその類似体が、従来知られていたグルコシダーゼでは十分にアグリコンが遊離されないことがわかり、本酵素の産業的利用が注目され始めている。従って、従来の茶葉などの給源に頼ることなく、工業的に大量に、更に安価に生産する方法の開発が強く望まれていた。

#### 発明の開示

本発明者らは上記問題点を解決すべく微生物にその給源を求めて鋭意研究を行った。すなわち、上述のような作用を有する酵素を生産する微生物を広く自然界に求めスクリーニングを重ねた結果、 $\beta$ -プリメベロシド等の二糖配糖体の糖部分を二糖単位で切断する作用を有する酵素生産能を有する発酵培養法に適した微生物を見出し、該酵素を単離精製し、該酵素をコードする遺伝子の塩基配列を決定した。さらに、糸状菌、酵母、細菌、放線菌等の多数の微生物に上述のような作用を有する酵素を見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、二糖配糖体、特に $\beta$ -プリメベロシド及び／又はその類似体、を二糖単位で切断する作用を有する酵素活性を含有する微生物由来の新規な酵素、当該酵素の製造方法、当該酵素をコードする遺伝子、当該遺伝子を含有するベクター、当該ベクターを導入した形質転換体、並びに当該酵素を用いた用途に関する。

本発明の酵素は、既存のグルコシダーゼが基質として利用しがたい二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有することで特徴付けられる。本明細書においては、上記の活性を有する酵素を「ジグリコシダーゼ」と呼ぶ。本発明のジグリコシダーゼは、二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性のみならず、単糖配糖体のグリコシド結合を切断する活性も保持しており、さらには、既存のグルコシダーゼが基質として利用しがたい修飾単糖配糖体（例えば、アセチルグルコシド、マロニルグルコシド、メチルグルコシド、ホスホグルコシド、アミドグルコシド等）のグリコシド結合

を切断する活性も有している。

本発明による、二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有する微生物由来の酵素は、その理化学的性質や遺伝子配列の相同性から植物由来の酵素とは異なるものである。

次いで本発明について詳細に説明する。

なお、本発明において各種酵素活性測定は特に記載しないかぎり、以下に記載する方法により行った値で表示する。

#### ① 二糖配糖体分解活性

活性の測定は自動化学分析装置（東芝社製、TBA-30R）を用いて行った。

酵素サンプル 30  $\mu$ l と二糖配糖体基質としてパラニトロフェニル（pNP）プリメベロシドを 2 mM に酢酸緩衝液（pH 5.5）に溶解せしめたもの 200  $\mu$ l と混合し、40℃、サイクルタイム 22.5 sec. で 9.75 分間反応させた後、炭酸ナトリウム 250  $\mu$ l を加え 412 nm の吸光度を測定した。サンプル由来のブランクの測定は基質溶液の代わりに 20 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）を用いて同様に測定した。

この条件下で吸光度を 1 上昇させる酵素量を 1 単位とした。

ここで用いた pNP-プリメベロシドは、例えば pNP-グルコシド（メルク社製）とキシロオリゴ糖（和光純薬社製）を酵素キシロシダーゼ（シグマ社製）を用いて反応させ、pNP-グルコシドにキシロースを  $\beta$ -1,6 結合で 1 残基転移させることにより合成できる。

#### ② $\beta$ -グルコシダーゼ活性

活性の測定は自動化学分析装置（東芝社製、TBA-30R）を用いて行った。

酵素サンプル 10  $\mu$ l と基質としてパラニトロフェニル（pNP）グルコシド（メルク社製）を 2 mM に酢酸緩衝液（pH 5.5）に溶解せしめたもの 200  $\mu$ l と混合し、40℃、サイクルタイム 22.5 sec. で反応させた後、炭酸ナトリウム 250  $\mu$ l を加え 412 nm の吸光度を測定した。サンプル由来のブランクの測定は基質溶液の代わりに 20 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）を用いて同様に測定した。

この条件下で吸光度を 1 上昇させる酵素量を 1 単位とした。

本発明者らは、ジグリコシダーゼ生産能を有する微生物を得るため、広く自然界

に給源を求め自然界から分離した数種の菌株が当該作用を有する酵素を生産することを見いだした。 $\beta$ -プリメベロシドに類似する二糖配糖体とは、アグリコン側にグルコースを有する二糖類であり、例えば、アピオフラノシルー $\beta$ -D-グルコピラノシド、アラビノフラノシルー $\beta$ -D-グルコピラノシド等が挙げられる。

本発明のジグリコシダーゼを生産する微生物は、例えば以下のようにしてスクリーニングすることができる。即ち、土壌の懸濁液を、オイゲニルプリメベロシド等を唯一の炭素源として含有する分離用液体培地に接種することにより集積培養を行い、その培養液を同様の分離用平板寒天培地に塗布して、生育したコロニーを選択して拾う。これらの菌株を適当な液体培地で培養して、pNP-プリメベロシド等から二糖を切り出し、pNP遊離活性を有する菌株を選択することができる。

このようにして選択された菌株について、更にpNP-プリメベロシド等を基質として二糖遊離を指標としてジグリコシダーゼ産生微生物をスクリーニングすることができる。

本発明者らが分離した主な菌株について、その菌学的性質を、下記の①～③の文献を参考にして同定した。

文献：

①Raper, K. B. and Fennell, D. I. 1965. "The genus *Aspergillus*",  
Williams & Wilkins, Baltimore.

②Kozakiewicz, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products.  
Mycological Papers, No.161, CAB International Mycological Institute.

③Al-Musallam, A. 1980. "Revision of the black *Aspergillus* species",  
University of Utrecht,

以下、菌学的性質を記載する。

#### 菌株Aの同定

生育状態

##### ① 生育状態

・ ツァベック寒天培地

コロニーの大きさは直径 48~50 mm (25℃、7 日)、表面はビロード状~粉状、菌糸は白色、分生子の形成はやや悪い、暗緑色 (dull green) ~ 灰緑色 (grayish green)、裏面は薄黄茶 (light yellowish brown) ~ 茶色 (brown)。

・ 麦芽エキス寒天培地

コロニーの大きさは直径 78~80mm (25℃、7 日)、表面はビロード状~粉状、菌糸は白色、分生子の形成は非常に良好、暗緑色 (dull green)~灰緑色(grayish green)、裏面は無色~黄白色 (yellowish white)。37℃ (3 日) でのコロニーの大きさは直径 73~75mm。45℃でもよく生育する。

② 形態

・ 分生子頭：

密な円筒状、長さ 48~128  $\mu\text{m}$ 、直径 16~52  $\mu\text{m}$ 、暗緑色 (dull green)~灰緑色(grayish green)。

・ 分生子柄：

基生菌糸より生じる、長さ 125~800  $\mu\text{m}$  (多くは 500  $\mu\text{m}$  以下)、直径 5~10  $\mu\text{m}$ 、まっすぐ~わずかに湾曲する、滑面。

・ 頂のう：

直径 10~25  $\mu\text{m}$ 、フラスコ形、上部 2/3 にフィアライドを形成する。

・ メトレ：

形成しない。

・ フィアライド：

5.6~12 $\times$ 2.4~3.2  $\mu\text{m}$

・ 分生子：

直径 2.6~3.6  $\mu\text{m}$ 、球形~亜球形、粗面。

・ 子のう胞子：

形成しない。

以上の結果より菌株Aは、分生子形成細胞が単列（メトレを形成しない）、分生子頭が円筒状で暗緑色～灰緑色、分生子が球形、子のう胞子を形成しないことから、アスペルギルス フミガタスグループに属する。更に、分生子頭が密な円筒状で、しかも うなずくような形(nodding appearance)にならない、分生子が粗面、多くの分生子柄が 500  $\mu$ m 以下であることから、アスペルギルス フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) である。

菌株B、菌株C及び菌株Dの同定

① 生育状態

表 1

培地	項目	菌株B	菌株C	菌株D
ツァペック寒 天培地	コロニーの直 径 (25℃、7 日)	45～48 mm	47～50 mm	46～48 mm
	コロニーの直 径 (25℃、14 日)	80 mm 以上	80 mm 以上	80 mm 以上
	菌糸層	密、白～黄 色	密、白色	密、白色
	分生子の形成	良好	良好	良好
	分生子の色	暗灰褐色か ら黒褐色	暗灰褐色から 黒褐色	暗灰褐色から 黒褐色
	裏面の色	白～黄色	白色	白色
麦芽エキス寒 天培地	コロニーの直 径 (25℃)	46～51 mm	53～55 mm	55～59 mm
	菌糸層	薄く平坦、 無色	薄く平坦、無 色	薄く平坦、無 色
	分生子の形成	非常に良好	非常に良好	非常に良好
	分生子の色	黒～黒褐色	黒～黒褐色	黒～黒褐色
	裏面の色	無色	無色	無色



## ② 形態（ツァベック寒天培地）

表 2

項目		菌株B	菌株C	菌株D
分生子頭	形	球形、放射状、 成熟すると円筒 状に裂けるもの がある	球形、放射状、 成熟すると円筒 状に裂けるもの がある	球形、放射状、成 熟すると円筒状に 裂けるものがある
	大きさ	120～560 $\mu\text{m}$	150～500 $\mu\text{m}$	125～350 $\mu\text{m}$
	色	暗灰褐色から黒 褐色	暗灰褐色から黒 褐色	暗灰褐色から黒褐 色
分生子柄	起源	基生菌糸から生 じる	基生菌糸から生 じる	基生菌糸から生じ る
	長さ	350 $\mu\text{m}$ ～3 mm	350 $\mu\text{m}$ ～3 mm	350 $\mu\text{m}$ ～2.5 mm
	直径	9～20 $\mu\text{m}$	10～22.5 $\mu\text{m}$	12.5～20 $\mu\text{m}$
	表面	滑面	滑面	滑面
頂のう	直径	20～80 $\mu\text{m}$	15（多くは35） ～80 $\mu\text{m}$	30～80 $\mu\text{m}$
	形	球形	球形	球形
	メトレの 形成部位	全面	全面	全面
メトレ	長さ	20～24 $\mu\text{m}$	12～22.4 $\mu\text{m}$	12.8～24 $\mu\text{m}$
	直径	5.6～7.2 $\mu\text{m}$	4.8～6.8 $\mu\text{m}$	5.6～8 $\mu\text{m}$
	形	球形～亜球形	球形～亜球形	球形～亜球形
	表面	粗面	粗面	粗面
子のう胞子		形成しない	形成しない	形成しない

以上の結果より菌株B、菌株C及び菌株Dは共に分生子形成細胞が複列（メトレとフィアライドを形成する）、分生子頭が球形で黒色系であることなどから、アスペルギルス ニガーグループに属する。更に、ツァベック寒天培地でコロニーの直径が14日で5 cm以上になる、分生子の表面が粗面(verrucose)である、分生子が6  $\mu\text{m}$ 以下で球形～亜球形、暗灰褐色～黒褐色である、分生子柄が6  $\mu\text{m}$ 以下であることなどから、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) var. *niger* である。

更に本発明者らは、タイプカルチャーよりアスペルギルス属に属する菌株をラ

ンダムに選択してその菌株によるジグリコシダーゼの生産能を確認した。その結果、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) IFO4407、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) IAM 2020、アスペルギルス フミガタス

(*Aspergillus fumigatus*) IAM2046 等にもその生産能が確認された。また、その他の様々な微生物においてもジグリコシダーゼ産生能のスクリーニングを行った。その結果、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ペニシリウム

(*Penicillium*) 属、リゾプス (*Rhizopus*) 属、リゾムコール (*Rhizomucor*) 属、タラロマイセス (*Talaromyces*) 属、モルチエレラ (*Mortierella*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アクチノプラネス

(*Actinoplanes*) 属等の様々な微生物にジグリコシダーゼ活性を確認した。

本発明において利用できる菌種は、ジグリコシダーゼ産生能を有する菌種であれば何れも使用することができ、上述した菌種に限定されない。更に、本発明において利用できる生産方法としては、ジグリコシダーゼ産生能を有する菌種の突然変異株、あるいは組換えDNA法によりジグリコシダーゼを生産できるように改変された各種微生物、或いは各種細胞（例えば、酵母細胞、細菌細胞、高等植物細胞、動物細胞等）をも包含し、特に、ジグリコシダーゼを高生産できるように改変されたものが好ましい。ジグリコシダーゼ遺伝子を導入することで、ジグリコシダーゼ産生能を付与する場合にはホストとなる微生物にはジグリコシダーゼ産生能がなくてもよい。

上述した各種微生物などを用いてジグリコシダーゼを製造するためには、当該微生物の培養に適合した方法や条件を設定でき、これらの方法や条件は特に限定されない。例えば、上述した各種菌種の培養法としては液体培養、固体培養の何れでも良いが、好ましくは液体培養が利用される。液体培養としては例えば、以下のようにして行うことができる。

使用できる培地としては、ジグリコシダーゼを生産する微生物が生育可能な培地であれば、如何なるものでも良い。例えば、グルコース、シュクロース、ゲンチビオース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等の炭

素源、更に硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、或いは、ペプトン、酵母エキス、コーンステイープリカー、カゼイン加水分解物、ふすま、肉エキス等の窒素源、更にカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等の無機塩を添加したものをを用いることができる。更に、ジグリコシダーゼを生産蓄積せしめるために培地に各種の誘導物質を添加することができる。誘導物質としては例えば糖類が使用でき、好ましくはゲントース（例えば、ゲントース#80、日本食品化工（株）、ゲンチビオース、ゲンチオリゴ糖（例えば、ゲンチオリゴ等、和光純薬工業（株））等が利用できる。これらの誘導物質の添加量は目的とするジグリコシダーゼの生産能が増大される量であれば特に限定されないが、好ましくは0.01～5%が添加される。

培地のpHは例えば約3～8、好ましくは約5～6程度に調製し、培養温度は通常約10～50℃、好ましくは約30℃程度で、1～15日間、好ましくは4～7日間程度好氣的条件下で培養する。培養法としては例えば振盪培養法、ジャーファーマンターによる好氣的深部培養法が利用できる。しかしながら、上述した各種の培養条件などは当然のことながら、培養する対象である微生物や細胞により適宜変更され、本発明のジグリコシダーゼが生産される条件であれば、その条件等は限定されない。

得られた培養液からジグリコシダーゼを単離精製するには、遠心分離、UF濃縮、塩析、イオン交換樹脂等の各種クロマトグラフィーを組み合わせ、常法により処理して、精製したジグリコシダーゼを得ることができる。

本発明の酵素組成物は上述の微生物を培養した培養液そのままでも利用できる。もちろん本培養液は本発明の使用目的に応じてその精製度合いを適宜変更することができる。

以下、本発明の二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有する微生物由来の酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターを導入した形質転換体、および、該形質転換体を用いて該酵素を製造する方法についてさらに説明する。

本発明の二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有する微生物由来の酵素としては、上述した製造法で得られるすべての酵素が含まれるが、特に、配列表の配列番号 8 に記載のアミノ酸配列において、1 個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも 1 つがなされているアミノ酸配列を有するポリペプチドが好ましく、さらに、配列表の配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドがより好ましい。

本発明の酵素をコードする遺伝子としては、該酵素を産生する微生物から該遺伝子のクローニングによって取得することができる遺伝子や該遺伝子に相同性を有する遺伝子があげられる。相同性としては、少なくとも 50% 以上の相同性を有する遺伝子、好ましくは 80% 以上の相同性を有する遺伝子、さらに好ましくは 95% 以上の相同性を有する遺伝子をあげることができる。本発明の酵素をコードする遺伝子としては以下のようなポリヌクレオチド (DNA または RNA) が好ましい。

下記 (a) ~ (g) から選択されるポリヌクレオチドからなり、かつ、二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

(a) 配列表の配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列表の配列番号 8 に記載のアミノ酸配列において、1 個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも 1 つがなされているアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列表の配列番号 7 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(d) 配列表の配列番号 7 に記載の塩基配列において、1 個又は複数個の塩基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも 1 つがなされている塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(e) 上記 (a) ~ (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子、

(f) 上記 (a) ~ (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチドに相同性を有す

るポリヌクレオチド、

(g) 上記 (a) ~ (f) の少なくともいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチドに縮重するポリヌクレオチド。

本発明の酵素をコードする遺伝子は、上述した本発明の酵素を産生する微生物から、例えば以下に記載するような方法で該遺伝子のクローニングを行うことによって取得することができる。まず、本発明の酵素を産生する微生物から上述の方法によって本発明の酵素を単離、精製し、その部分アミノ酸配列に関する情報を得る。

部分アミノ酸配列決定方法としては、例えば、精製した酵素を直接常法に従ってエドマン分解法〔ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第 256 巻、第 7990~7997 頁 (1981)〕によりアミノ酸配列分析〔プロテインシーケンサ 476A、アプライド バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製等〕に供してもよいし、あるいはタンパク質加水分解酵素を作用させて限定加水分解を行い、得られたペプチド断片を分離精製し、得られた精製ペプチド断片についてアミノ酸配列分析を行うのが効果的である。

こうして得られる部分アミノ酸配列の情報を基に、本発明の酵素をコードする遺伝子をクローニングする。一般的に、PCR を用いる方法あるいはハイブリダイゼーション法を利用してクローニングを行うことができる。

ハイブリダイゼーション法を利用する場合、例えば、モレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル〔Molecular Cloning, A Laboratory Manual、T. マニアティス (T. Maniatis) 他著、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、1989 年発行〕に記載の方法を用いることができる。

また、PCR 法を利用する場合、以下のような方法を用いることができる。

まず、本発明の酵素を産生する微生物のゲノム DNA を鋳型とし、部分アミノ酸配列の情報を基にデザインした合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて PCR 反応を行い、目的の遺伝子断片を得る。PCR 法は、PCR テクノロジー〔PCR Technology、エルリッヒ (Erlich) HA 編集、ストックトンプレス社

(Stockton press)、1989 年発行] に記載の方法に準じて行う。更に、この増幅 DNA 断片について通常用いられる方法、例えば、ジデオキシチェンターミネーター法で塩基配列を決定すると、決定された配列中に合成オリゴヌクレオチドプライマーの配列以外に本発明の酵素の部分アミノ酸配列に対応する配列が見出され、目的の本発明の酵素遺伝子の一部を取得することができる。もちろん得られた遺伝子断片をプローブとして更にハイブリダイゼーション法等を行うことによって本発明の酵素全長をコードする遺伝子をクローニングすることができる。

下記の実施例ではアスペルギルス フミガタス IAM2046 を用い、PCR 法を利用して、本発明の酵素をコードする遺伝子を決定した。アスペルギルス フミガタス由来の本発明の酵素をコードする遺伝子の全塩基配列は、配列番号 7 に記載したものであり、これによってコードされるアミノ酸配列は配列番号 8 に記載したものであると決定された。なお、配列番号 8 に記載したアミノ酸配列に対応する塩基配列は配列番号 7 に記載したもの以外に無数に存在するが、これらはすべて本発明の範囲に含まれる。

配列番号 8 に記載のアミノ酸配列や配列番号 7 に記載の塩基配列の情報を元にして、化学合成によって目的とする遺伝子を得ることもできる(参考文献：ジーン (Gene)、第 60(1)巻、第 115-127 頁 (1987))。

また、本発明の本発明の酵素遺伝子は、配列番号 8 に記載のアミノ酸配列において、1 個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも 1 つがなされているアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドや該ポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子、該ポリヌクレオチドに相同性を有するポリヌクレオチド、及び該ポリヌクレオチドに縮重するポリヌクレオチドもそれらがコードするポリペプチドが本発明の酵素活性を有する限り本発明に含まれる。

ここでいう「ストリンジェントな条件下」とは、例えば以下の条件をいう。6 ×SSC、1.0%ブロッキング剤、0.1%N-ラウロイルザルコシナトリウム、0.02%SDS。

アスペルギルス フミガタス IAM2046 を用いて全塩基配列が明らかにされた

本発明の酵素遺伝子の全体あるいは一部分をハイブリダイゼーション用のプローブとして用いて、他の本発明の酵素を産生する微生物のゲノム DNA ライブラリーあるいは cDNA ライブラリーから、配列表 7 の本発明の酵素遺伝子と相同性の高い DNA を選別することができる。

ハイブリダイゼーションは、上記に示したストリンジェントな条件下で行うことができる。例えば、本発明の酵素を産生する微生物から得たゲノム DNA ライブラリーあるいは cDNA ライブラリーを固定化したナイロン膜を作成し、6×SSC、0.5% SDS、5×デンハルツ、100 µg/ml サケ精子 DNA を含むプレハイブリダイゼーション溶液中、65℃でナイロン膜をブロックする。その後、<sup>32</sup>Pあるいはジゴキシゲニンでラベルした各プローブを加えて、68℃で一晩保温する。このナイロン膜を 0.1% SDS を含む 6×SSC 中、室温で 10 分間、0.1% SDS を含む 6×SSC 中、45℃で 30 分間洗浄した後、オートラジオグラフィーをとり、プローブと特異的にハイブリダイズする DNA を検出することができる。また、洗いなどの条件を変えたり、ハイブリダイズの温度を下げる（例えば 45℃）ことによって様々な相同性を示す遺伝子を得ることができる。

一方、本発明の遺伝子の塩基配列から PCR 反応用のプライマーをデザインすることができる。このプライマーを用いて PCR 反応を行うことによって、本発明の遺伝子と相同性の高い遺伝子断片を検出したり、更にはその遺伝子全体を得ることもできる。

得られた遺伝子が目的の本発明の酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であるかどうかを確認するには、決定された塩基配列を本発明の本発明の酵素の塩基配列又はアミノ酸配列と比較し、その遺伝子構造及び相同性から推定することもできる。また、得られた遺伝子のポリペプチドを製造し、本発明の酵素活性を測定することにより、目的の本発明の酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であるかどうか確認することができる。

本発明の酵素遺伝子を用いて、本発明の酵素活性を有するポリペプチドを生産するには以下の方法が便宜である。

まず、目的の本発明の酵素遺伝子を含むベクターを用いて宿主の形質転換を行

い、次いで該形質転換体の培養を通常用いられる条件で行うことによって、本発明の酵素活性を有するポリペプチドを生産させることができる。

また、宿主としては微生物、動物細胞、植物細胞等を用いることができる。微生物としては、大腸菌、バチルス (*Bacillus*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属等の細菌、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属等の酵母、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属、リゾプス (*Rhizopus*) 属等の糸状菌が挙げられる。動物細胞としては、バキュロウイルスの系統が挙げられる。

発現の確認や発現産物の確認は、本発明の酵素に対する抗体を用いて行うことが簡便であるが、本発明の酵素活性を測定することにより発現の確認を行うこともできる。

形質転換体の培養物から本発明の酵素を精製するには上述のように、遠心分離、UF 濃縮、塩析、イオン交換樹脂等の各種クロマトグラフィーを適宜組み合わせて行うことができる。

また、本発明により本発明の酵素の一次構造及び遺伝子構造が明らかとなったことにより、本発明の遺伝子を用いて、ランダム変異あるいは部位特異的変異を導入し、天然の本発明の酵素のアミノ酸配列中に、1 個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも 1 つがなされている遺伝子を得ることが可能である。これにより、本発明の酵素活性を有するが、至適温度、安定温度、至適 pH、安定 pH、基質特異性等の性質が少し異なった本発明の酵素をコードする遺伝子を得ることが可能であり、遺伝子工学的にこれら本発明の酵素を製造することが可能となる。

ランダム変異を導入する方法としては、例えば、DNA を化学的に処理する方法として、亜硫酸水素ナトリウムを作用させシトシン塩基をウラシル塩基に変換するトランジション変異を起こさせる方法 [プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ USA、第 79 巻、



第 1408～1412 頁 (1982))、生化学的方法として、[ $\alpha$ -S] dNTP 存在下、二本鎖を合成する過程で塩基置換を生じさせる方法 [ジーン (Gene)、第 64 巻、第 313～319 頁 (1988)]、PCR を用いる方法として、反応系にマンガンを加えて PCR を行い、ヌクレオチドの取込みの正確さを低くする方法 [アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第 224 巻、第 347～353 頁 (1995)] 等を用いることができる。

部位特異的変異を導入する方法としては、例えば、アンバー変異を利用する方法 [ギャップド デュプレックス (gapped duplex) 法、ヌクレイック アシッズ リサーチ (Nucleic Acids Research)、第 12 巻、第 24 号、第 9441～9456 頁 (1984)]、制限酵素の認識部位を利用する方法 [アナリティカル バイオケミストリー、第 200 巻、第 81～88 頁 (1992)、ジーン、第 102 巻、第 67～70 頁 (1991)]、dut (dUTPase) と ung (ウラシル DNA グリコシラーゼ) 変異を利用する方法 [クンケル (Kunkel) 法、プロシーディングズ オブ ザ ナショナル オブ サイエンス オブ ザ USA、第 82 巻、第 488～492 頁 (1985)]、DNA ポリメラーゼ及び DNA リガーゼを用いたアンバー変異を利用する方法 [オリゴヌクレオチドダイレクティッド デュアル アンバー (Oligonucleotide-directed Dual Amber : ODA) 法、ジーン、第 152 巻、第 271～275 頁 (1995)、特開平 7-289262 号公報]、DNA の修復系を誘導させた宿主を利用する方法 (特開平 8-70874 号公報)、DNA 鎖交換反応を触媒するタンパク質を利用する方法 (特開平 8-140685 号公報)、制限酵素の認識部位を付加した 2 種類の変異導入用プライマーを用いた PCR による方法

(USP5,512,463)、不活化薬剤耐性遺伝子を有する二本鎖 DNA ベクターと 2 種類のプライマーを用いた PCR による方法 [ジーン、第 103 巻、第 73～77 頁 (1991)]、アンバー変異を利用した PCR による方法 [国際公開 WO98/02535 号公報] 等を用いることができる。

また、市販されているキットを使用することにより、部位特異的変異を容易に導入することができる。市販のキットとしては、例えば、ギャップド デュプレックス法を用いた Mutan (登録商標) -G (宝酒造社製)、クンケル法を用いた

Mutan (登録商標) -K (宝酒造社製)、ODA 法を用いた Mutan (登録商標) -Express Km (宝酒造社製)、変異導入用プライマーとピロコッカス フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) 由来 DNA ポリメラーゼを用いた QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit [ストラタジーン (STRATAGENE) 社製] 等を用いることができ、また、PCR 法を利用するキットとして、TaKaRa LA PCR in vitro Mutagenesis Kit (宝酒造社製)、Mutan (登録商標) -Super Express Km (宝酒造社製) 等を用いることができる。

このように、本発明により、本発明の酵素の一次構造及び遺伝子構造が提供されたことにより、本発明の酵素活性を有するポリペプチドの安価で高純度な遺伝子工学的な製造が可能となる。

なお、本明細書では種々の文献等を引用したが、これらはすべて参考として本明細書に組み込まれるものである。

次いで、本発明の酵素組成物を用いた各種の用途について述べる。

ジグリコシダーゼは、各種成分、例えば植物材料の香気、色、生理活性含有量等を増強したり、これらの成分の抽出効率を調節することに使用できる。従って、より香気の高い食物、飲料やより香りの高いスパイスや香料、香水などの製造に利用でき、更に前述の製造時における処理において適宜利用することにより、好ましくない香りの早期放出にも使用できる。また、色に関しては植物材料、食物、飲料の色合い改善、発色、あるいは色素の製造に利用できる。

更には、香気成分と同様に、品質上好ましくない色素前駆体の分解除去にも使用でき、生理活性に関しては生薬、ハーブ、その他植物性成分の薬理成分や有用生理活性成分の増強やあるいは好ましくない成分の分解除去に使用できる。

即ち、各種の二糖配糖体成分に本発明のジグリコシダーゼを作用させることによって前述の作用をもたらすことが可能である。

さらに、本発明のジグリコシダーゼを上記生理活性物質等と混合して投与する、あるいは、混合せずに同時または短時間の間隔で投与することにより、生理活性物質等のより効率的な体内吸収が可能になる。

本発明の対象とする二糖配糖体を含有する物としては、ジグリコシダーゼの作

用を受けるものであればいかなるものであってもよく、例えば、食品、化粧品、医薬品、医薬部外品、農薬、飼料等であり、より具体的には各種香気を有する食品、トイレタリー製品、木工製品や畳などの植物性材料から作られる工業製品などの製造にも利用できる。

本発明のジグリコシダーゼが好ましく利用される対象としては、香気成分を有する食品が挙げられる。具体的に述べるとウーロン茶、ジャスミン茶等の製造において、例えば「萎調」の工程で使用したり、紅茶（CTC法によるティーパック用紅茶など）の香気増強、ワインの香気増強に利用できる。また、化粧品の香気保持や香水の香気保持、医薬品における香気の改善や薬理効果の改善にも利用できる。

更に、色素の製造においても有用である。例えば、西洋茜からのルベリトリン酸からの染料アリザリンの抽出に用いることによって、従来よりも効率よく色素の抽出を行うことができる。

また、ジグリコシダーゼを利用して香気、色素、生理活性成分とプリメベロース等の二糖成分に作用させてその前駆体を製造することも可能である。これら成分は配糖化することにより安定性、保存性の改善や無毒化、薬理成分のDDS化も期待できる。

さらに、ジグリコシダーゼは既存のグルコシダーゼが基質として利用しがたいアセチルグルコシド、マロニルグルコシド、メチルグルコシド、ホスホグルコシド、アミドグルコシドといった修飾グルコシドを従来のグルコシダーゼより効率よく分解できる。この特性を利用して大豆中に含まれるイソフラボンのアセチルグルコシドやマロニルグルコシドをアグリコンフォームに変換させることにより、イソフラボンの吸収性や収率の改善を行える。

さらに、切り花等に本酵素溶液を吹きかけるか、あるいは、吸収させることで花の香りを増強させることも可能である。

ジグリコシダーゼの利用方法としては、その対象とするものの形態によりその添加方法、添加量、反応方法などを適宜変更することができる。

具体的な利用方法としては、香気前駆体を含有する植物抽出物あるいは醗酵産

物に本発明のジグリコシダーゼを加えてインキュベートする。その条件は、本発明のジグリコシダーゼが香気、色素、生理活性成分前駆体に作用し香気、色素、生理活性成分を遊離できる条件であれば特に限定されないが、その条件については当業者が多大な労力を費やすことなく設定できる。この条件の基で、当該成分濃度を上昇させることができる。

また、本発明の酵素を植物中に存在する香気、色素、生理活性成分濃度の上昇にも利用できる。即ち、植物はこれら成分の前駆体を有しているため、植物に有効量の本発明のジグリコシダーゼを与え（遺伝子導入を含む）、当該植物中の前駆体が加水分解できる条件下で栽培することにより植物の香気、色素、生理活性成分を上昇させることができる。また、本発明の酵素組成物を利用することにより、対象となる植物中の香気、色素、生理活性成分等の生成時期を調節することができる。

なお、本発明のジグリコシダーゼの逆反応を利用することにより、各種配糖体の合成も可能である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はその要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではないことはいうまでもない。以下、本発明を実施例を用いて詳述するが本発明はこれらに限定されるものではない。以下、特に明記しない限り、本明細書において、%は w/v%で示した。

#### 実施例 1

アスペルギルス ニガー IFO4407 ならびにアスペルギルス ニガー IAM2020 を前培養培地（組成；0.2%酵母エキス、0.5%ペプトン、2%グルコース、0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH5.7）にて 30℃ 一晚振とう培養後、培養液を本培養培地（4%大豆粉、0.3%食塩、0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2%可溶性デンプン、1%赤ふすま、pH5.6）に 1/100 量接種し 6 日間振とう培養し、培養液から菌体を除去して粗酵素液を得た。この酵素液について、ジグリコシダーゼ活性及び  $\beta$ -グルコシダーゼ活性を測定した。

その結果、IFO4407 株でジグリコシダーゼ活性は 0.129 単位/ml であり、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性は 4.34 単位/ml、また IAM2020 株でジグリコシダーゼ活性は 0.156 単位/ml であり、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性は 5.97 単位/ml あった。

#### 実施例 2

実施例 1 に従って、アスペルギルス フミガタス IAM2046 株を同様に前培養し、培養液を本培養培地（2%大豆粉、0.3%食塩、0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3%可溶性デンプン、0.5%ゲントース（日食社製）、pH5.6）に 4 日間培養し、粗酵素液を得た。その結果、ジグリコシダーゼ活性は 0.106 単位/ml であり、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性は 0.320 単位/ml であった。

#### 実施例 3

アスペルギルス フミガタス IAM2046 株を用いてジグリコシダーゼ生産における誘導物質の影響について検討した。アスペルギルス フミガタス IAM2046 株を培地（2%大豆粉、0.3%食塩、0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3%可溶性デンプン）に各種糖を 0.1%加え 6 日間培養し、ジグリコシダーゼ活性を測定した。その結果を表 3 に示す。

表 3

誘導物質	誘導能 (%)
無添加	100
イソマルトース	145
マルトトリオース	171
マルトース	136
ゲントース	235
ゲンチビオース	211
ゲンチオリゴ糖	180
スクロース	116
トレハロース	113
グルコース	164
ガラクトース	125
フルクトース	143
ラムノース	129
ツルボース	116
マルチトール	142
アラビトール	112
ガラクチトール	142
エンサングルコサミン	157

上記表より明らかなように、各種糖によりジグリコシダーゼの生産能が増大した。特にゲントース、ゲンチビオース、ゲンチオリゴ糖に特に高い誘導能が見られた。

更に、アスペルギルス ニガー IFO4407 及びアスペルギルス ニガー IAM2020 においても同様の効果が見られた。

#### 実施例 4

実施例 1、2 で得られた粗酵素液を分子量 6,000 カットの限外ろ過膜で濃縮した。次いで、この濃縮液 1 ml と 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で 5 mg/ml に調製された pNP-プリメベロシド溶液 1 ml とを混合し、37℃でインキュベートした。1、2、4、24、48 時間後のサンプルをそれぞれ回収し、薄層クロマトグラフ (TLC) にてプリメベロースの遊離を確認した。

その結果 TLC で実施例 1 記載のアスペルギルス ニガー 2 株及び実施例 2 記載

のアスペルギルス フミガタスの培養液のいずれにおいても二糖であるプリメベロースと同じ位置にスポットを観察できた。粗酵素濃縮液を熱処理（100℃、10分）し、同様の実験を行ったサンプルではこのようなスポットは観察されなかった。したがって、粗酵素濃縮液中に pNP-プリメベロシドからプリメベロースを二糖単位で遊離する酵素の存在が確認された。

## 実施例 5

### 種々の微生物におけるジグリコシダーゼのスクリーニング

#### a) 酵素サンプル調製法

スクリーニングを実施する微生物それぞれについて前培養、本培養を行った。液体培養の場合は得られた培養ブ罗斯を  $10,000 \text{ min}^{-1}$ 、10 min. で遠心分離し、上清を酵素サンプルとした。固体培養の場合は、培養終了後の培地を水で抽出した浸液を酵素サンプルとした。

なお、細菌については菌体内酵素についても検討を行った。この場合は培養ブ罗斯を遠心分離した後、沈殿として得られる菌体側を生理食塩水で洗浄し、菌体重量に対し 10 倍量の 10 mM リン酸バッファー（pH 7.0）に懸濁して超音波にて菌体を破砕した。その破砕液を  $12,000 \text{ min}^{-1}$ 、20 min. で遠心分離し、その上清を菌体内酵素サンプルとした。

培養に関する培地・培養条件を表 1 から表 5 に示した。

表 1 糸状菌・酵母の液体培養

#### 前培養 培地組成

酵母エキス (DIFCO)	0.2%
ペプトン (DIFCO)	0.5%
グルコース (片山化学)	2.0%
リン酸 2 水素 1 カリウム (関東化学)	0.1%
硫酸マグネシウム 7 水和物 (片山化学)	0.05%

上記組成を精製水に溶解し、1M 塩酸、1M 水酸化ナトリウムにて pH 5.7 に調整した。培地 100 ml を坂口フラスコに分注後、121℃、20 分間、1 気圧で滅菌して使用した。

## 前培養 培養条件

振とう速度  $140 \text{ min}^{-1}$ 、スラントより 1 エーゼ接種、1 日以上培養、温度条件  $30^\circ\text{C}$  で培養した。酵母については温度条件を  $25^\circ\text{C}$  とした。

## 本培養 培地組成

ソーヤフラワーA (日清)	2.0%
塩化ナトリウム (関東化学)	0.3%
リン酸 1 水素 2 カリウム (関東化学)	0.1%
硫酸マグネシウム 7 水和物 (片山化学)	0.05%
可溶性デンプン (和光純薬)	3.0%
ゲントース#80 (日本食品加工)	0.5%

上記組成を精製水に溶解し、1M 塩酸、1M 水酸化ナトリウムにて pH 5.6 に調整した。培地 100 ml を坂口フラスコに分注後、 $121^\circ\text{C}$ 、20 分間、1 気圧で滅菌して使用した。

ゲントース#80 の添加培地、不添加培地両方で培養を実施して検討した。

## 本培養 培養条件

振とう速度  $140 \text{ min}^{-1}$ 、前培養ブロスより 1 ml 接種、5 日間培養、温度条件  $30^\circ\text{C}$  で培養した。酵母については温度条件を  $25^\circ\text{C}$  とした。

## 表 2 糸状菌・酵母の固体培養

## 前培養 培地組成

高デンプンふすま (B 扇、日本製粉)	8.3%
---------------------	------

上記組成を精製水に懸濁し、培地 9 ml を培養試験管に分注後、 $121^\circ\text{C}$ 、20 分間、1 気圧で滅菌して使用した。

## 前培養 培養条件

振とう速度  $300 \text{ min}^{-1}$ 、スラントより 1 エーゼ接種、1 から 2 日間培養、温度条件  $30^\circ\text{C}$  で培養した。

## 本培養 培地組成

フスマ 5.0g を精製水 1.5 ml に懸濁し、100 ml 容三角フラスコに分注後、



121℃、20 分間、1 気圧で滅菌して使用した。

本培養 培養条件

前培養ブロスより 1 ml 接種、3 日間培養、温度条件 30℃で培養した。

抽出

水道水 90 ml を加え、8℃以下で一晩抽出する。

表 3 細菌・放線菌の培養

前培養 培地組成

・ Tryptic soy broth (DIFCO)

BACTO Tryptone	1.7%	} pH 7.3 ± 0.2
BACTO Soytone	0.3%	
BACTO Dextrose	0.2%	
塩化ナトリウム	0.5%	
リン酸水素 2 カリウム	0.25%	

上記組成を精製水に溶解し、培地 100 ml を坂口フラスコに分注後、121℃、20 分間、1 気圧で滅菌して使用した。

前培養 培養条件

振とう速度 140 min<sup>-1</sup>、スラントより 1 エーゼ接種、1 日以上培養、温度条件 30℃で培養した。

本培養 培地組成

ポリペプトン (日本製薬)	1.0%
酵母エキス(DIFCO)	0.25%
硫酸アンモニウム (和光純薬)	0.1%
リン酸水素 2 カリウム (関東化学)	0.05%
硫酸マグネシウム 7 水和物 (片山化学)	0.025%
塩化カルシウム (和光純薬)	0.0001%
アデカノール LG126 (旭電化)	0.001%

ゲントース#80（日本食品加工） 0.5%

上記組成を精製水に溶解し、1M 塩酸、1M 水酸化ナトリウムにて pH 7.0 に調整した。培地 100 ml を坂口フラスコに分注後、121℃、20 分間、1 気圧で滅菌して使用した。

ゲントース#80 の添加培地、不添加培地両方で培養を実施して検討した。

本培養 培養条件

振とう速度 140 min<sup>-1</sup>、前培養ブロスより 1 ml 接種、5 日間培養、温度条件 30℃で培養した。

表 4 *Penicillium multicolor* の培養

前培養 培地組成

脱脂大豆“ソイプロ”（ホーネン精油）	2.0%
ブドウ糖（片山化学）	3.0%
リン酸 2 水素 1 カリウム（関東化学）	0.5%
硫酸アンモニウム（和光純薬）	0.4%
乾燥酵母	0.3%
アデカノール（旭電化）	0.05%

上記組成を精製水に溶解し、培地 100 ml を坂口フラスコに分注後、121℃、20 分間、1 気圧で滅菌して使用した。

培養 培養条件

振とう速度 140 min<sup>-1</sup>、スラントより 1 エーゼ接種、5 日以上培養、温度条件 27℃で培養した。

本培養 培地組成

ゲントース#80（日本食品加工）	3.0%
リン酸 2 水素 1 カリウム（関東化学）	2.0%
硫酸アンモニウム（和光純薬）	1.0%
ミースト P1G（アサヒビール食品）	3.13%
アデカノール LG126（旭電化）	0.05%

上記組成を精製水に溶解し、培地 100 ml を坂口フラスコに分注後、121℃、20 分間、1 気圧で滅菌して使用した。

本培養 培養条件

振とう速度 140 min<sup>-1</sup>、前培養ブロスより 1 ml 接種、6 日間培養、温度条件 27℃で培養した。

表 5 *Corynebacterium* 属の培養

前培養 培地組成

グルコース	0.2%
酵母エキス	0.1%
硝酸アンモニウム	0.4%
リン酸 2 水素 1 カリウム	0.15%
リン酸水素ナトリウム・12 水和物	0.15%
硫酸マグネシウム・7 水和物	0.02%
硫酸第一鉄・7 水和物	0.0001%
塩化カルシウム・2 水和物	0.001%

上記組成を精製水に溶解し、1M 塩酸、1M 水酸化ナトリウムにて pH 7.0 に調整した。培地 10 ml を培養試験管に分注後、121℃、20 分間、1 気圧で滅菌して使用した。

前培養 培養条件

振とう速度 300 min<sup>-1</sup>、スラントより 1 エーゼ接種、2 日間培養、温度条件 30℃で培養した。

本培養 培地組成

オイゲニルーβ-プリメベロシド	0.2%
酵母エキス	0.1%
硝酸アンモニウム	0.4%
リン酸 2 水素 1 カリウム	0.15%
リン酸水素ナトリウム・12 水和物	0.15%

硫酸マグネシウム・7水和物	0.02%
硫酸第一鉄・7水和物	0.0001%
塩化カルシウム・2水和物	0.001%

上記組成を精製水に溶解し、1M 塩酸、1M 水酸化ナトリウムにて pH 7.0 に調整した。培地 10 ml を培養試験管に分注後、121℃、20 分間、1 気圧で滅菌して使用した。

#### 本培養 培養条件

振とう速度 140 min<sup>-1</sup>、前培養ブロスより 1 ml 接種、1 日間培養、温度条件 30℃で培養した。

#### b) 基質溶液調製法

pNP-β-プリメベロシドを 5 mg/ml となるよう 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解し、これを基質溶液 A とした。オイゲニル-β-プリメベロシドを 10 mg/ml となるよう 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解し、これを基質溶液 B とした。

#### c) 酵素反応方法

基質溶液 A をマイクロ遠沈管に 100 μl とり、酵素サンプル 100 μl を加え 37℃の恒温水槽中で 96 時間酵素反応を行った。目的時間に達した後、100℃、10 分間で本反応液を処理し、酵素反応を終了した。これを酵素反応終了液とした。

酵素サンプルの比較対照として、酵素反応前に酵素サンプルを 100℃、10 分間処理したサンプルも同様に反応を行った。酵素反応は基質溶液 A、基質溶液 B それぞれについて実施した。基質溶液 B を用いる場合も、基質溶液 A と同様に行った。

#### d) 薄層クロマトグラフィー

酵素反応終了液 20 μl をとりシリカゲルの薄層 (Silica gel 60 F254 [1.05554], メルク (Merck) 社) にスポットし、乾燥させた。これを酢酸エチル：酢酸：精製水=3:1:1 の割合で混合した展開溶媒にて 2 回展開した。展開終了後に薄層を風乾させた。

その後、硫酸：メタノール＝20：80 の割合で混合した発色試薬を展開終了後の薄層全体に噴霧し、105℃、約 10 分間の条件で発色させた。

発色後の薄層にプリメベロースのスポットが現れた酵素サンプルについて、プリメベロシダーゼが存在すると判定し、この生産菌をジグリコシダーゼ生産菌と判定した。

e) ジグリコシダーゼ生産菌スクリーニング結果

以上の評価法によって見いだされたジグリコシダーゼ生産菌の一覧を表 6 示す。

表 6 ジグリコシダーゼ生産が見出された菌株一覧

微生物群	菌株名
糸状菌	アスペルギルス オリゼ ( <i>Aspergillus oryzae</i> ) IAM 2769
	アスペルギルス ニガー ( <i>Aspergillus niger</i> ) IAM 2020 IFO 4091 IFO 9455 IAM 2107
	アスペルギルス アキュラタス ( <i>Aspergillus aculeatus</i> )
	ペニシリウム ルゴサルム ( <i>Penicillium rugulosum</i> ) IFO 7242
	ペニシリウム リラシナム ( <i>Penicillium lilacinum</i> ) IFO 5350
	ペニシリウム デカベンス ( <i>Penicillium decumbence</i> ) IFO 31297
	ペニシリウム マルチカラー ( <i>Penicillium multicolor</i> ) IAM 7153
	リゾプス オリザエ ( <i>Rhizopus oryzae</i> ) JCM 5560
	リゾムコール プシラス ( <i>Rhizomucor pusillus</i> ) IAM 6122
	リゾムコール ミーハイ ( <i>Rhizomucor miehei</i> ) IFO 9740
	タラロマイセス エマーソニー ( <i>Talaromyces emersonii</i> ) IFO 9747
	モルチェレラ ベナセア ( <i>Mortierella vinacea</i> ) IFO 7875
酵母	クリプトコッカス アルビダス ( <i>Cryptococcus albidus</i> ) IAM 12205
細菌	ミクロバクテリウム アルボレセンス ( <i>Microbacterium arborescens</i> ) JCM 5884
	コリネバクテリウム アンモニアジンス ( <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> ) IFO 12072
	コリネバクテリウム アンモニアジンス ( <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> ) IFO 12612
	コリネバクテリア グルタミカム ( <i>Corynebacterium glutamicum</i> ) IFO 1318
放線菌	アクチノプランス ミズーリエンシス ( <i>Actinoplanes missouriensis</i> ) JCM 3121

## 実施例 6

### アスペルギルス フミガタス由来ジグリコシダーゼの精製

前培養としてブドウ糖ペプトン培地（酵母エキス 0.2%、ペプトン 0.5%、ブドウ糖 2%、リン酸 1 カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.05%、pH 5.7）にアスペルギルス フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) IAM2046 を接種し、30℃ 24 時間振盪培養した。前培養を本培地（ソーマフラワー 2%、塩化ナトリウム 0.3%、リン酸 2 カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.05%、可溶性デンプン 3%、ゲントース#80 1%、pH 5.6）に 1%接種し、30℃、6 日間振盪培養した。

濾紙ろ過により培養液から菌体を除き、ろ液 8600 ml を分子量 6,000 カットの限外ろ過膜（AIP-1010、旭化成製）で 710 ml に濃縮した。濃縮液 200 ml を 4℃、15000 rpm、10 分間の遠心分離し、上清 192 ml に硫酸アンモニウム 55.9 g（50%飽和）加え、4℃で一晩攪拌した。4℃、15000 rpm、10 分間の遠心分離で得られた沈殿物を 20%飽和硫酸アンモニウム／20 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）10 ml に溶解し、4℃、15000 rpm、10 分間遠心分離後の上清を回収した。この上清 9.5 ml を、20%飽和硫酸アンモニウム／20 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化したフェニルセファロースカラム（16 x 100 mm、ファルマシア社製）に供し、20%から 0%の硫酸アンモニウム直線濃度勾配により吸着した蛋白質を遊離させた。活性ピークを回収し、10DG カラム（BIO-RAD 社製）を用いて 25mM トリエタノールアミン緩衝液（pH 8.3）にバッファー交換し、25 mM トリエタノールアミン緩衝液（pH 8.3）で平衡化した陰イオン交換 Mono-P カラム（5 x 200 mm、ファルマシア社製）に供し、Polybuffer（pH5.0、ファルマシア社製）で溶出し、pH 8.3 から pH 5.0 の pH 直線濃度勾配により吸着した蛋白質を遊離させ、ジグリコシダーゼの精製酵素標品を得た。SDS-PAGE により 47 kDa の単一バンドとして精製されていることが確認された。また、エンドグリコシダーゼ H（ベーリンガー・マンハイム（BOEHRINGER MANNHEIM）社製）処理したところ、バンドの大きさの変化は確認されなかった。

## 実施例 7

### アスペルギルス フミガタス由来のジグリコシダーゼの理化学的性質

至適 pH は以下のようにして測定した。20 mM 第二クエン酸-HCl 緩衝液で pH2-5 の各 pH に調製した 2 mM pNP-ブリメベロシド溶液 400  $\mu$ l を 37℃で 5 分間インキュベートした。次に酵素溶液 90  $\mu$ l を加え 37℃で 20 分間反応を行なった。0.5M 炭酸ナトリウム溶液 500  $\mu$ l を加え反応を停止させ、420 nm の吸光度を測定し活性測定を行なった。その結果、至適 pH は 2.5-3.0 であることが分かった。植物由来の同様の活性を有する酵素に比べ pH 3 というより低い pH で十分な化成を有することが分かった。

至適温度は以下のようにして測定した。20 mM 第二クエン酸-HCl 緩衝液 (pH 2.5) で調製した 2 mM pNP-ブリメベロシド溶液 400  $\mu$ l に酵素溶液を 90  $\mu$ l 加え 30-65℃で 20 分間反応を行なった。0.5M 炭酸ナトリウム溶液 500  $\mu$ l を加え反応を停止させ、420 nm の吸光度を測定し活性測定を行なった。植物由来の同様の酵素活性を有する酵素に比べ 60℃でも 80%の活性を有し、十分な活性が保持されていることが分かった。

pH 安定性は以下のようにして測定した。pH 2-5 の第二クエン酸緩衝液、pH 6-8 のリン酸緩衝液、pH 7-10 のグリシン NaCl-NaOH 緩衝液で精製酵素評品を 100 倍希釈し 37℃で 1 時間処理した後、その 90  $\mu$ l を 2 mM pNP-ブリメベロシド溶液 (pH 2.5) 400  $\mu$ l を 37℃で 5 分間インキュベートしたものに加え 37℃で 20 分間反応を行なった。0.5M 炭酸ナトリウム溶液 500  $\mu$ l を加え反応を停止させ、420 nm の吸光度を測定し活性測定を行ない残存活性を求めた。その結果 pH 安定性は pH 8 で 100%であり、pH 3-8 で安定であった。植物由来の類似の活性を有する酵素が pH 4-7 で安定に比べ、より広い pH 範囲で安定である事が分かった。

熱安定性は精製評品を 20 mM グリシン NaCl-NaOH 緩衝液 (pH 8) で 100 倍希釈し、30-55℃の各温度で 1 時間処理後、残存活性を測定し調べた。その結果、50℃以下の温度で活性は安定であった。植物由来の類似の活性を有する酵素が 45℃以下で安定であるのに比べ、より広い温度範囲で安定である事が分



かった。

#### 他の微生物由来ジグリコシダーゼの理化学的特性

実施例 5 に示す同様の方法で産生を確認したジグリコシダーゼの理化学的特性を調べた。その結果、至適 pH は 3-6、で pH 3 以下で実用的な活性を有すること、至適温度は 30-60℃で、60℃以上でも実用的な活性を有すること、また、安定性においては pH 3-8、50℃以下で安定であることが分かった。このように、微生物由来ジグリコシダーゼは植物由来の類似の酵素に比べより広い pH と温度範囲で使用でき、しかも安定性に優れている。

#### 実施例 8

##### アスペルギルス フミガタス由来のジグリコシダーゼをコードする遺伝子の単離

本明細書においては、遺伝子操作手法は特に記載しない限り成書（例えば、モレキュラークローニング、第 2 版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、1989 (Molecular Cloning<sup>2nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)) に従って行った。

##### a) 染色体 DNA の単離

ブドウ糖ペプトン培地（酵母エキス 0.2%、ペプトン 0.5%、ブドウ糖 2%、リン酸 1 カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.05%、pH 5.7）にアスペルギルス フミガタス (*Aspergillus fumigatus* IAM2046) を接種し、30℃、3 日間振盪培養した。

Michael J Hynes (Molecular and Cellular Biology, 1983, Vol.3, No.8, 1430-1439)の方法に従って、300 ml のカルチャーから、12.6 mg/ml の濃度の染色体 DNA を 0.2 ml 得た。

##### b) 部分アミノ酸配列決定実施例

実施例で得られたジグリコシダーゼの精製酵素標品をプロテインシークエンサー（ヒュレット パッカード社製）に供し、配列番号 1 に示す 22 残基の N 末端アミノ酸配列を決定した。次に実施例で得られたジグリコシダーゼの精製酵素標品を還元カルボキシルメチル化後、リジルエンドペプチダーゼによる分解を行った。得られた分解物を逆相液体クロマトグラフィーに供し、分解されたペプチド

画分の一つをプロテインシーケンサーに供し、配列番号 2 に示す 22 残基の内部アミノ酸配列を決定した。

配列番号 1

Ala-Ala-Ser-Ala-Ser-Ala-Tyr-Cys-Ser-Asn-Ser-Ala-Gly-Asn-Tyr-  
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Ala-Ala

配列番号 2

Leu-Met-Thr-Pro-Ala-Gly-Ala-Asn-Phe-Ala-Leu-Met-Arg-His-Thr-  
Ile-Gly-Ala-Ser-Asp-Leu-Ser

c) PCR による DNA プローブの作成

N 末端アミノ酸配列および内部アミノ酸配列をもとに、以下の 4 種の混合オリゴヌクレオチドを DNA 合成機により合成し、PCR プライマーとした。

配列番号 3

センス・プライマー：

5'-ACGAATTCAA(TC)(TA)(CG)IGC(TCAG)GGIAA(TC)TA(TC)AA-3'

配列番号 4

センス・プライマー：

5'-CGGAATTCTA(TC)TG(TC)(TA)(CG)IAA(TC)(TA)(CG)IGC(TCAG)GG-3'

配列番号 5

アンチセンス・プライマー：

5'-TCAAGCTTGC(AG)AA(AG)TTIGC(TCAG)CCIGC(TCAG)GG-3'

配列番号 6

アンチセンス・プライマー：

5'-AGAAGCTTGCICC(TAG)ATIGT(AG)TG(TCAG)C(TG)CAT

これらのプライマーとアスペルギルス フミガタスの染色体 DNA を鋳型として、以下の条件下、GeneAmp PCR System 9600 (パーキンエルマー (Perkin Elmer) 社) を用いて PCR 反応を行った。

#### <PCR 反応液>

10 x PCR 反応緩衝液 (パーキンエルマー (Perkin Elmer) 社)	10 $\mu$ l
dNTP 混合液 (各 2mM、パーキンエルマー (Perkin Elmer) 社)	10 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub> (パーキンエルマー (Perkin Elmer) 社)	6 $\mu$ l
染色体 DNA 溶液 (100 $\mu$ g/ml)	1 $\mu$ l
40 $\mu$ M センス・プライマー	2.5 $\mu$ l
40 $\mu$ M アンチセンス・プライマー	2.5 $\mu$ l
滅菌水	67.5 $\mu$ l
Amplitaq Gold (5 u/ $\mu$ l、パーキンエルマー (Perkin Elmer) 社)	0.5 $\mu$ l

#### <PCR 反応条件>

ステージ 1： 変性 (95℃、9 分)	1 サイクル
ステージ 2： 変性 (94℃、45 秒)	30 サイクル
アニール (55℃、1 分)	
伸長 (72℃、2 分)	
ステージ 3： 伸長 (72℃、10 分)	1 サイクル

得られた約 0.27kbp の DNA 断片を puc19 (TOYOBO 社) に、クローニング後、塩基配列を確認したところ、センス・プライマーの直後とアンチセンス・プライマーの直前に、上記の部分アミノ酸配列をコードする塩基配列が見いだされ

た。本 DNA 断片を遺伝子クローニングのための DNA プローブとした。

d) 遺伝子ライブラリーの作製

アスペルギルス フミガタスより Total RNA を回収し、Poly(A)Quick mRNA Isolation Kit (ストラタジーン (STRATAGENE) 社製) を用いて Poly(A) RNA を調製した。次に ZAP-cDNA Synthesis Kit (ストラタジーン

(STRATAGENE) 社製) を用いて cDNA を合成し、 $\lambda$  ZAP II ベクター (ストラタジーン (STRATAGENE) 社製) にライゲーションし、Gigapack III Gold (ストラタジーン (STRATAGENE) 社製) を用いてパッケージングし遺伝子ライブラリーを得た。

e) 遺伝子ライブラリーのスクリーニング

上記 c) で得た 0.27kbp の DNA 断片を DIG-High Prime (ベーリンガーマンハイム (BOEHRINGER MANNHEIM) 社製) を用いて標識した。これを DNA プローブとして、d) で得た遺伝子ライブラリーをブラーク・ハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた陽性ブラークからファージを回収した後、ストラタジーン (STRATAGENE) 社のインストラクションに従い、インビボイクシジション (*In vivo* Excision) 法により、約 1.7kbp の cDNA を含むプラスミド pAFPri を得た。

f) 塩基配列の決定

ジグリコシダーゼをコードする塩基配列を配列番号 7 に示す。また配列番号 7 によりコードされるアミノ酸配列を配列番号 8 に示す。このアミノ酸配列中には、b) で決定した N 末端アミノ酸配列 (配列番号 1) および内部アミノ酸配列 (配列番号 2) が見出され、この DNA 断片がジグリコシダーゼの遺伝子断片であることが確認された。

配列番号 7

```
gccgcctctg cttcggctta ctgtccaac tcggccggca actacaagct gtcctccatc 60
gcagctccgg ttcaaggggc cggaaacccc ggctcggaat cgacctggca attgaccgtt 120
gacgacactt cgtccggtca caaacagacg atagttgggt tcggtgctgc tgtcactgat 180
```

```

gccacggtca cctcgttcaa cactttgtcc gcctccgtgc tgcaagactt gctcaataaa 240
ctgatgacac ctgccggggc gaactttgct ttgatgacac atactattgg ggcttcggat 300
ctgtccggtg acccagccta cacgtacgat gacaatggtg ggaaagcga tccgtcactg 360
tcgggattca acctggggga ccgcggaacg gctatggcca agatgttggc aacaatgaag 420
tctctgcagc ccaacctcaa gatcctcggc tctccctgga gtgcaccagg atggatgaag 480
ctgaacgggg tccttgatgg caatacgaac aacaacaact tgaacgatgg atacctaacc 540
agtgggggaa ccggtagtag ggggtatgcc agtcaattcg cgcagtactt tgtcaagtag 600
attcaggcct ataagaatct cgggtgctac gtcgacgcga ttaccatcca gaacgagccg 660
ctgttcagct cagcgggcta tcccaccatg tatgtctacg attatgagtc ggcacagctg 720
atccagaact acatcggccc cgctcttgcc agcgcggggc tagatacga aatctgggct 780
tatgaccaca acacagatgt cccgtcgtac cccagactg tccttaacca ggccggtcag 840
tacgtcaagt cgggtggcctg gcaactgtac gctcccaacg tcgactggac cgtgctcagc 900
cagttccaca acacaaaccc tggagtgaag caatatatga ccgagtgtg gactccagca 960
tctggcgcgt ggcacagggc ggcggacttc accatgggtc ccctgcagaa ctgggcctcg 1020
ggagtggcag catggactct gggaaccaac gtcaggatg gtccgcatct gtccactggc 1080
ggctgcgcga catgtcaagg cttggtgacc atcaacaacg gaggatacac gctcaacacc 1140
gcatactaca tgatggcgca attcagcaag ttcatgccgc ctggtgcgat tgtgtcaat 1200
ggcagtggca gctacacgta ctctggcgga ggcggtatcc agtccgtggc ttccttgaat 1260
cccgatggaa cccgcactgt gggtattgaa aacacttttg gcaatgatgt ctatgtgact 1320
gtcactatga agagcgggca gaagtggagt gggaacgccc ctagccaatc cgtgactacc 1380
tgggttcttc catctgcttg a                                     1401

```

## 配列番号 8

```

Ala Ala Ser Ala Ser Ala Tyr Cys Ser Asn Ser Ala Gly Asn Tyr Lys
 1           5           10
Leu Ser Ser Ile Ala Ala Pro Val Gln Gly Ala Gly Asn Pro Gly Ser
      20           25           30
Glu Ser Thr Trp Gln Leu Thr Val Asp Asp Thr Ser Ser Gly His Lys
 35           40           45

```

Gln Thr Ile Val Gly Phe Gly Ala Ala Val Thr Asp Ala Thr Val Thr  
 50 55 60  
 Ser Phe Asn Thr Leu Ser Ala Ser Val Leu Gln Asp Leu Leu Asn Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Met Thr Pro Ala Gly Ala Asn Phe Ala Leu Met Arg His Thr Ile  
 85 90 95  
 Gly Ala Ser Asp Leu Ser Gly Asp Pro Ala Tyr Thr Tyr Asp Asp Asn  
 100 105 110  
 Gly Gly Lys Ala Asp Pro Ser Leu Ser Gly Phe Asn Leu Gly Asp Arg  
 115 120 125  
 Gly Thr Ala Met Ala Lys Met Leu Ala Thr Met Lys Ser Leu Gln Pro  
 130 135 140  
 Asn Leu Lys Ile Leu Gly Ser Pro Trp Ser Ala Pro Gly Trp Met Lys  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Gly Val Leu Asp Gly Asn Thr Asn Asn Asn Asn Leu Asn Asp  
 165 170 175  
 Gly Tyr Leu Thr Ser Gly Gly Thr Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Ser Gln  
 180 185 190  
 Phe Ala Gln Tyr Phe Val Lys Tyr Ile Gln Ala Tyr Lys Asn Leu Gly  
 195 200 205  
 Ala His Val Asp Ala Ile Thr Ile Gln Asn Glu Pro Leu Phe Ser Ser  
 210 215 220  
 Ala Gly Tyr Pro Thr Met Tyr Val Tyr Asp Tyr Glu Ser Ala Gln Leu  
 225 230 235 240  
 Ile Gln Asn Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Ala Ser Ala Gly Leu Asp Thr  
 245 250 255  
 Glu Ile Trp Ala Tyr Asp His Asn Thr Asp Val Pro Ser Tyr Pro Gln  
 260 265 270  
 Thr Val Leu Asn Gln Ala Gly Gln Tyr Val Lys Ser Val Ala Trp His  
 275 280 285  
 Cys Tyr Ala Pro Asn Val Asp Trp Thr Val Leu Ser Gln Phe His Asn  
 290 295 300  
 Thr Asn Pro Gly Val Lys Gln Tyr Met Thr Glu Cys Trp Thr Pro Ala  
 305 310 315 320  
 Ser Gly Ala Trp His Gln Ala Ala Asp Phe Thr Met Gly Pro Leu Gln  
 325 330 335  
 Asn Trp Ala Ser Gly Val Ala Ala Trp Thr Leu Gly Thr Asn Ala Gln  
 340 345 350

Asp Gly Pro His Leu Ser Thr Gly Gly Cys Ala Thr Cys Gln Gly Leu  
 355 360 365  
 Val Thr Ile Asn Asn Gly Gly Tyr Thr Leu Asn Thr Ala Tyr Tyr Met  
 370 375 380  
 Met Ala Gln Phe Ser Lys Phe Met Pro Pro Gly Ala Ile Val Leu Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Ser Gly Gly Gly Ile Gln Ser Val  
 405 410 415  
 Ala Ser Leu Asn Pro Asp Gly Thr Arg Thr Val Val Ile Glu Asn Thr  
 420 425 430  
 Phe Gly Asn Asp Val Tyr Val Thr Val Thr Met Lys Ser Gly Gln Lys  
 435 440 445  
 Trp Ser Gly Asn Ala Pro Ser Gln Ser Val Thr Thr Trp Val Leu Pro  
 450 455 460  
 Ser Ala  
 465

この遺伝子のオープンリーディングフレームを配列番号 9 に示す。配列番号 1  
 0 に示すように、全体が 488 アミノ酸の Pre 体としてコードされており、うち  
 N-末端の 22 残基が Pre 領域と推定され、残りの 466 残基が成熟体に対応する  
 (配列番号 8 を参照)。

本発明は二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性  
 を有するポリペプチドやそれをコードするヌクレオチドに特に限定されるもので  
 はなく、該ポリペプチドからなる更に長いポリペプチド (例えば、Pre 体) やそ  
 れをコードするヌクレオチドを含むものである。

#### 配列番号 9

ggcgacacca gaaagcaacc aagagcacga cacggactta tttctctttg aca atg 56  
 Met  
 cgt ata tct gtc ggt gct ctg ctt ggc ttg aca gcc ctg agt cat gcc 104  
 Arg Ile Ser Val Gly Ala Leu Leu Gly Leu Thr Ala Leu Ser His Ala  
 -20 -15 -10  
 aca aca gag aaa cga gcc gcc tct gct tcg gct tac tgt tcc aac tcg 152  
 Thr Thr Glu Lys Arg Ala Ala Ser Ala Ser Ala Tyr Cys Ser Asn Ser  
 -5 -1 1 5 10

gcc ggc aac tac aag ctg tcc tcc atc gca gct ccg gtt caa ggg gcc Ala Gly Asn Tyr Lys Leu Ser Ser Ile Ala Ala Pro Val Gln Gly Ala	200
gga aac ccc ggc tcg gaa tcg acc tgg caa ttg acc gtt gac gac act Gly Asn Pro Gly Ser Glu Ser Thr Trp Gln Leu Thr Val Asp Asp Thr	248
tcg tcc ggt cac aaa cag acg ata gtt ggg ttc ggt gct gct gtc act Ser Ser Gly His Lys Gln Thr Ile Val Gly Phe Gly Ala Ala Val Thr	296
gat gcc acg gtc acc tcg ttc aac act ttg tcc gcc tcc gtg ctg caa Asp Ala Thr Val Thr Ser Phe Asn Thr Leu Ser Ala Ser Val Leu Gln	344
gac ttg ctc aat aaa ctg atg aca cct gcc ggg gcg aac ttt gct ttg Asp Leu Leu Asn Lys Leu Met Thr Pro Ala Gly Ala Asn Phe Ala Leu	392
atg cga cat act att ggg gct tcg gat ctg tcc ggt gac cca gcc tac Met Arg His Thr Ile Gly Ala Ser Asp Leu Ser Gly Asp Pro Ala Tyr	440
acg tac gat gac aat ggt ggg aaa gcg gat ccg tca ctg tcg gga ttc Thr Tyr Asp Asp Asn Gly Gly Lys Ala Asp Pro Ser Leu Ser Gly Phe	488
aac ctg ggg gac cgc gga acg gct atg gcc aag atg ttg gca aca atg Asn Leu Gly Asp Arg Gly Thr Ala Met Ala Lys Met Leu Ala Thr Met	536
aag tct ctg cag ccc aac ctc aag atc ctc ggc tct ccc tgg agt gca Lys Ser Leu Gln Pro Asn Leu Lys Ile Leu Gly Ser Pro Trp Ser Ala	584
cca gga tgg atg aag ctg aac ggg gtc ctt gat ggc aat acg aac aac Pro Gly Trp Met Lys Leu Asn Gly Val Leu Asp Gly Asn Thr Asn Asn	632
aac aac ttg aac gat gga tac cta acc agt ggg gga acc ggt agt acg Asn Asn Leu Asn Asp Gly Tyr Leu Thr Ser Gly Gly Thr Gly Ser Thr	680
ggg tat gcc agt caa ttc gcg cag tac ttt gtc aag tac att cag gcc Gly Tyr Ala Ser Gln Phe Ala Gln Tyr Phe Val Lys Tyr Ile Gln Ala	728
tat aag aat ctc ggt gct cac gtc gac gcg att acc atc cag aac gag Tyr Lys Asn Leu Gly Ala His Val Asp Ala Ile Thr Ile Gln Asn Glu	776
ccg ctg ttc agc tca gcg ggc tat ccc acc atg tat gtc tac gat tat Pro Leu Phe Ser Ser Ala Gly Tyr Pro Thr Met Tyr Val Tyr Asp Tyr	824



gag tcg gca cag ctg atc cag aac tac atc ggc ccc gct ctt gcc agc Glu Ser Ala Gln Leu Ile Gln Asn Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Ala Ser 240 245 250	872
gcg ggg cta gat acg gaa atc tgg gct tat gac cac aac aca gat gtc Ala Gly Leu Asp Thr Glu Ile Trp Ala Tyr Asp His Asn Thr Asp Val 255 260 265	920
ccg tcg tac ccc cag act gtc ctt aac cag gcc ggt cag tac gtc aag Pro Ser Tyr Pro Gln Thr Val Leu Asn Gln Ala Gly Gln Tyr Val Lys 270 275 280	968
tcg gtg gcc tgg cac tgc tac gct ccc aac gtc gac tgg acc gtg ctc Ser Val Ala Trp His Cys Tyr Ala Pro Asn Val Asp Trp Thr Val Leu 285 290 295	1016
agc cag ttc cac aac aca aac cct gga gtg aag caa tat atg acc gag Ser Gln Phe His Asn Thr Asn Pro Gly Val Lys Gln Tyr Met Thr Glu 300 305 310 315	1064
tgc tgg act cca gca tct ggc gca tgg cat cag gcg gcg gac ttc acc Cys Trp Thr Pro Ala Ser Gly Ala Trp His Gln Ala Ala Asp Phe Thr 320 325 330	1112
atg ggt ccc ctg cag aac tgg gcc tcg gga gtg gca gca tgg act ctg Met Gly Pro Leu Gln Asn Trp Ala Ser Gly Val Ala Ala Trp Thr Leu 335 340 345	1160
gga acc aac gct cag gat ggt ccg cat ctg tcc act ggc ggc tgc gcg Gly Thr Asn Ala Gln Asp Gly Pro His Leu Ser Thr Gly Gly Cys Ala 350 355 360	1208
aca tgt caa ggc ttg gtg acc atc aac aac gga gga tac acg ctc aac Thr Cys Gln Gly Leu Val Thr Ile Asn Asn Gly Gly Tyr Thr Leu Asn 365 370 375	1256
acc gca tac tac atg atg gcg caa ttc agc aag ttc atg ccg cct ggt Thr Ala Tyr Tyr Met Met Ala Gln Phe Ser Lys Phe Met Pro Pro Gly 380 385 390 395	1304
gcg att gtg ctc aat ggc agt ggc agc tac acg tac tct ggc gga ggc Ala Ile Val Leu Asn Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Ser Gly Gly Gly 400 405 410	1352
ggt atc cag tcc gtg gct tcc ttg aat ccc gat gga acc cgc act gtg Gly Ile Gln Ser Val Ala Ser Leu Asn Pro Asp Gly Thr Arg Thr Val 415 420 425	1400
gtt att gaa aac act ttt ggc aat gat gtc tat gtg act gtc act atg Val Ile Glu Asn Thr Phe Gly Asn Asp Val Tyr Val Thr Val Thr Met 430 435 440	1448
aag agc ggg cag aag tgg agt ggg aac gcc cct agc caa tcc gtg act Lys Ser Gly Gln Lys Trp Ser Gly Asn Ala Pro Ser Gln Ser Val Thr 445 450 455	1496

acc tgg gtt ctt cca tct gct tga aaagagtga gtttcagatg gtttagatatg 1550  
 Thr Trp Val Leu Pro Ser Ala  
 460 465

tattgaagag tagcgcttgg agacatcaat agcctttttc taattacatg tcgtgcagct 1610  
 tccaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aactcga 1647

## 配列番号 1 O

Met Arg Ile Ser Val Gly Ala Leu Leu Gly Leu Thr Ala Leu Ser His  
 1 5 10 15

Ala Thr Thr Glu Lys Arg Ala Ala Ser Ala Ser Ala Tyr Cys Ser Asn  
 20 25 30

Ser Ala Gly Asn Tyr Lys Leu Ser Ser Ile Ala Ala Pro Val Gln Gly  
 35 40 45

Ala Gly Asn Pro Gly Ser Glu Ser Thr Trp Gln Leu Thr Val Asp Asp  
 50 55 60

Thr Ser Ser Gly His Lys Gln Thr Ile Val Gly Phe Gly Ala Ala Val  
 65 70 75 80

Thr Asp Ala Thr Val Thr Ser Phe Asn Thr Leu Ser Ala Ser Val Leu  
 85 90 95

Gln Asp Leu Leu Asn Lys Leu Met Thr Pro Ala Gly Ala Asn Phe Ala  
 100 105 110

Leu Met Arg His Thr Ile Gly Ala Ser Asp Leu Ser Gly Asp Pro Ala  
 115 120 125

Tyr Thr Tyr Asp Asp Asn Gly Gly Lys Ala Asp Pro Ser Leu Ser Gly  
 130 135 140

Phe Asn Leu Gly Asp Arg Gly Thr Ala Met Ala Lys Met Leu Ala Thr  
 145 150 155 160

Met Lys Ser Leu Gln Pro Asn Leu Lys Ile Leu Gly Ser Pro Trp Ser  
 165 170 175

Ala Pro Gly Trp Met Lys Leu Asn Gly Val Leu Asp Gly Asn Thr Asn  
 180 185 190

Asn Asn Asn Leu Asn Asp Gly Tyr Leu Thr Ser Gly Gly Thr Gly Ser  
 195 200 205

Thr Gly Tyr Ala Ser Gln Phe Ala Gln Tyr Phe Val Lys Tyr Ile Gln  
 210 215 220

Ala Tyr Lys Asn Leu Gly Ala His Val Asp Ala Ile Thr Ile Gln Asn  
 225 230 235 240  
 Glu Pro Leu Phe Ser Ser Ala Gly Tyr Pro Thr Met Tyr Val Tyr Asp  
 245 250 255  
 Tyr Glu Ser Ala Gln Leu Ile Gln Asn Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Ala  
 260 265 270  
 Ser Ala Gly Leu Asp Thr Glu Ile Trp Ala Tyr Asp His Asn Thr Asp  
 275 280 285  
 Val Pro Ser Tyr Pro Gln Thr Val Leu Asn Gln Ala Gly Gln Tyr Val  
 290 295 300  
 Lys Ser Val Ala Trp His Cys Tyr Ala Pro Asn Val Asp Trp Thr Val  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Gln Phe His Asn Thr Asn Pro Gly Val Lys Gln Tyr Met Thr  
 325 330 335  
 Glu Cys Trp Thr Pro Ala Ser Gly Ala Trp His Gln Ala Ala Asp Phe  
 340 345 350  
 Thr Met Gly Pro Leu Gln Asn Trp Ala Ser Gly Val Ala Ala Trp Thr  
 355 360 365  
 Leu Gly Thr Asn Ala Gln Asp Gly Pro His Leu Ser Thr Gly Gly Cys  
 370 375 380  
 Ala Thr Cys Gln Gly Leu Val Thr Ile Asn Asn Gly Gly Tyr Thr Leu  
 385 390 395 400  
 Asn Thr Ala Tyr Tyr Met Met Ala Gln Phe Ser Lys Phe Met Pro Pro  
 405 410 415  
 Gly Ala Ile Val Leu Asn Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Ser Gly Gly  
 420 425 430  
 Gly Gly Ile Gln Ser Val Ala Ser Leu Asn Pro Asp Gly Thr Arg Thr  
 435 440 445  
 Val Val Ile Glu Asn Thr Phe Gly Asn Asp Val Tyr Val Thr Val Thr  
 450 455 460  
 Met Lys Ser Gly Gln Lys Trp Ser Gly Asn Ala Pro Ser Gln Ser Val  
 465 470 475 480  
 Thr Thr Trp Val Leu Pro Ser Ala  
 485

### 実施例 9

#### β-プリメベロシダーゼの糸状菌での発現確認

## a) 発現カセットの構築

クローニングされた遺伝子がプリメロシダーゼ遺伝子であるか否かを確認するために、得られた DNA の発現を確認した。アスペルギルス オリゼ

(*Aspergillus oryzae*) タカアミラーゼを含むプラスミド pTG-Taa (Kato M, Aoyama A, Naruse F, Kobayashi T, Tsukagoshi N (1997) An *Aspergillus nidulans* nuclear protein, AnCP, involved in enhancement of Taka-amylase A gene expression binds to the CCAAT-containing *taaG2*, *amdS*, and *gatA* promoters. Mol Gen Genet 254:119-126) を鋳型とし、

プライマーTAA5'

配列番号 1 0

センス・プライマー:

5'-GGGCCTGCAGGAATTCATGGTGTT-3'

とプライマーTP3'

配列番号 1 1

アンチセンス・プライマー:

5'-CGAGCCGGGGTTTCCGTCCGCAGGCGTTGC-3'

で PCR にて増幅しフラグメントを得た。

#### <PCR 反応液>

鋳型 DNA 溶液 (50 µg/ml)	1 µl
50 µM センス・プライマー	1 µl
50 µM アンチセンス・プライマー	1 µl
滅菌水	22 µl
Premix Taq (EX Taq Version TaKaRa)	23 µl

#### <PCR 反応条件>

ステージ 1:	変性 (95℃、1 分)	1 サイクル
ステージ 2:	変性 (95℃、1 分)	30 サイクル
	アニール (55℃、1 分)	

伸長 (72℃、1 分)

ステージ 3 : 伸長 (72℃、5 分) 1 サイクル

また、DNA を含むプラスミド pAFPri を鋳型としプライマー dPC5'

配列番号 1 2

センス・プライマー :

5'-GCAACGCCTGCGGACGGAAACCCCGGCTCG -3'

とプライマー PC3'

配列番号 1 3

アンチセンス・プライマー :

5'-GCGCAAGCTTGAAGCTGCACGACATGTAA-3'

で PCR にて増幅しフラグメントを得た。

さらに各フラグメントを回収混合後、プライマー TAA 5' とプライマー PC 3' で PCR にて増幅しフラグメントを得た。このフラグメントはアスペルギルス オリゼ (*Aspergillus oryzae*) タカアミラーゼのプロモーターから成熟タンパク質 N 末 5 番目アミノ酸までと、 $\beta$ -プリメベロシダーゼ成熟タンパク質 N 末 28 番目アミノ酸 (グリシン) から C 末端まで含む。得られたフラグメントの上流には Sse8387I を下流には HindIII サイトを導入してある。フラグメントを制限酵素 Sse8387I と HindIII で処理し回収した。

ターミネーター領域は pTG-Taa を鋳型とし、プライマー TAAH

配列番号 1 4

センス・プライマー :

5'-GCGCAAGCTTTGAAGGGTGGAGAGT-3'

とプライマー TAA3'

配列番号 1 5

アンチセンス・プライマー :

5'-GCGCCCTGCAGGTCTAGAATTCCTAGTGGTT-3'

でPCRにて増幅しフラグメントを得た。

得られたフラグメントの上流には HindIII を下流には Sse8387I サイトを導入してある。フラグメントを制限酵素 HindIII と Sse8387I で処理し回収した。

マーカー遺伝子であるオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素 (pyr4) を含むプラスミド pTG1 (Kato M (1997) Mol Gen Genet 254:119-126) を制限酵素 Sse8387I 処理、アルカリフォスファターゼ処理後、回収した。

この3つのフラグメントを連結したプラスミド pAFPriE1 (マーカー遺伝子の方向に対して順方向) と pAFPriE2 (逆方向) を得た。

#### b)形質転換株の取得

オロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素 (pyrG) 株であるアスペルギルス ニジュールス (*Aspergillus nidulans*) G191 (Kato M (1997) Mol Gen Genet 254:119-126)を完全培地 (2% モルトエキストラクト、0.1% ペプトン、2% グルコース、0.1% ウリジン、2 µg/ml p-アミノ安息香酸、pH6.5) に接種し、30℃18時間振とう培養する。菌体をろ過により集菌し、プロトプラスト溶液 (0.8M NaCl、10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、20mM CaCl<sub>2</sub>、3.75mg/ml Novozyme234) に懸濁後、30℃、1時間振とうする。ろ過によりプロトプラストを回収し、1500 rpm、5分遠心分離により、プロトプラストを沈殿物として得た。この沈殿物を 0.8M NaCl 溶液に懸濁し、1500 rpm、5分遠心分離により沈殿物を集めた。0.8M NaCl/50 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液に再懸濁し、1500 rpm、5分遠心分離により沈殿物を集めた。適当量の 0.8M NaCl・50 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液に懸濁し、プロトプラスト溶液を得た。次にこのプロトプラスト溶液 50 µl に、20 µg の DNA 溶液、12.5µl の PEG 溶液 (25% PEG6000/50 mM CaCl<sub>2</sub>/10 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を加え混合後、氷上に 20 分静置した。次に 0.5 ml の PEG を加え混合後、氷上に 5 分静置した。次に 1 ml の 0.8M NaCl/50 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液を加え混合した。この混合液 0.5 ml を、予め 50℃に保温しておいた 15 ml の 2%アガーを含む再生培地 (0.6% NaNO<sub>3</sub>、11 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、7 mM KCl、1.2M ソルビトール、0.05% MgSO<sub>4</sub>・7 H<sub>2</sub>O、1% グルコース、2 µg/ml p-アミノ安息香酸、pH 6.5) と混合しシャー

レで固化させ、37℃で3日間培養した。

pTG1、pAFPriE1、pAFPriE2のプラスミドDNAについて行った。

プレート上に出現したコロニーについて単胞子分離した。pTG1からは15株、pAFPriE1からは23株、pAFPriE2からは13株の形質転換株を取得した。

#### c) 形質転換株の評価

形質転換株の評価はpTG1からは8株、pAFPriE1からは18株、pAFPriE2からは12株について行った。各形質転換株について酵素生産確認培地（1% ポリペプトン、0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%  $\text{NaNO}_3$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2% マルトース、4  $\mu\text{g/ml}$  p-アミノ安息香酸、0.1% トレースエレメント溶液 (Trace element solution)) (Core DJ., Biochem. Biophys. Acta 1966, 113 巻、P. 51-56) に接種し、30℃ 96 時間振とう培養した。48 時間、72 時間、96 時間と培養液をサンプリングし、ろ過後のろ液について活性を観察した。pTG1、pAFPriE2 の形質転換株についていずれも酵素活性は確認されなかったが、pAFPriE1 の形質転換株 5 株について酵素活性が確認された。

#### 実施例 10

##### ハイブリダイゼーション法による植物遺伝子との比較

茶由来のジグリコシダーゼと類似の酵素の遺伝子をプローブとして、我々がジグリコシダーゼの存在を確認した微生物の染色体上に類似の構造を持つ遺伝子が存在するか否か調べた。茶由来のジグリコシダーゼと類似の酵素の遺伝子断片の調製は坂田・水谷らの報告（第73回日本農芸化学学会）と特願平11-56299を参照に行なった。

微生物の染色体の調製法は以下のように行なった。

酵母・カビ類からの染色体調製は Molecular and Cellular Biology Vol. 3 pp1430-1439 (1983) に従って行なった。細菌の染色体 DNA の調製は斎藤と三浦の方法 (Biochim. Biophys. Acta Vol.72, pp619-629, 1963 年) に従って行なった。放線菌の染色体 DNA は Iefuji らの方法 (Biosci. Biotech. Biochem. Vol.60, pp1331-1338, 1996 年) に従って調製した。

このように得られた各種染色体 DNA 10  $\mu\text{g}$  をアスペルギルス フミガタス

(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス アキュラタス (*Aspergillus aculeatus*)、ペニシリウム リラシナム (*Penicillium lilacinum*)、ペニシリウム デカベンス (*Penicillium decumbence*)、ペニシリウム マルチカラー (*Penicillium multicolor*)、タラロマイセス エマーソニー (*Talaromyces emersonii*)、モルチェレラ ベナセア (*Mortierella vinacea*)、クリプトコッカス アルビダス (*Cryptococcus albidus*)、コリネバクテリウム アンモニアジンス (*Corynebacterium ammoniagenes*)、コリネバクテリア グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、ミクロバクテリウム アルボレセンス (*Microbacterium arborescens*)、ペニシリウム ルゴサルム (*Penicillium rugolusum*) の場合 BamHI で、リゾプス オリザエ (*Rhizopus oryzae*)、リゾムコール プシラス (*Rhizomucor pusillus*)、リゾムコール ミーハイ (*Rhizomucor miehei*)、アクチノプランス ミズーリエンシス (*Actinoplanes missouriensis*) の場合、EcoRI で消化し 1%アガロースゲルにて電気泳動した。またコントロールとしてプローブとして用いた茶由来のジグリコシダーゼと類似の酵素の遺伝子断片を同じゲルに電気泳動した。電気泳動後 DNA をナイロンメンブランにプロットし、DIG システムキット (ベーリンガーマンハイム社) を用いて添付の使用説明書に従い、前述の茶由来のジグリコシダーゼと類似の酵素の遺伝子断片 p (成熟植物プリメベロシダーゼ遺伝子の構造遺伝子部分) を標識したものをプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。その結果、ハイブリダイゼーション条件 (5 x SSC、1% ブロッキング剤、0.1% N-ラウロイルサルコシンナトリウム、0.02% SDS、68℃、一晚)、洗浄条件 (6 x SSC、0.1% SDS、室温、5 min. x 2 と 6 x SSC、0.1% SDS、45℃、15 min. x 2) で検出を行なったところ、植物遺伝子をプロットした位置にシグナルを得たが微生物ゲノムをプロットした他のいかなる部分にもシグナルを認めなかった。したがって、微生物のジグリコシダーゼ遺伝子は植物プリメベロシダーゼ遺伝子とは異なる構造を有すると思われる。

一方、上記と同様の方法と条件によって、実施例 8 で得たアスペルギルス フ



ミガタス (*Aspergillus fumigatus*) IAM2020 由来の本発明のジグリコシダーゼ遺伝子をプローブとして、我々がジグリコシダーゼの存在を確認した微生物の染色体上に類似の構造を持つ遺伝子が存在するか否か調べた。その結果、これらの微生物においてシグナルを検出した。

さらに、アスペルギルス オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス アキュラタス (*Aspergillus aculeatus*)、ペニシリウム マルチカラー (*Penicillium multicolor*)、ペニシリウム リラシナム (*Penicillium lilacinum*)、コリネバクテリウム アンモニアジンス (*Corynebacterium ammoniagenes*)、コリネバクテリア グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ではよりストリンジェンシーの厳しい条件の洗浄 (5 x SSC、室温、10 分と 4 x SSC、68℃、30 分) においてもシグナルを検出できた。

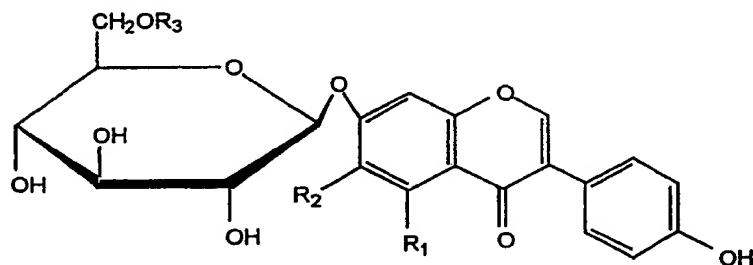
#### 実施例 1 1

##### イソフラボン配糖体におけるのジグリコシダーゼのイソフラボン分解活

イソフラボン配糖体には下表のようにグルコシドと修飾グルコシドであるアセチルグルコシド、マロニルグルコシドが存在する。ジグリコシダーゼによるアセチルタイプとマロニルグルコシドの分解活性、即ちアグリコン遊離活性を調べた。

イソフラボン	分子量	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	濃度
グリシチン (Glycitin)	446.4	H	OCH <sub>3</sub>	H	2 mM
ゲニスチン (Genistin)	432.4	OH	H	H	2 mM
ダイジン (Daidzin)	416.4	H	H	H	2 mM
アセチルグリシチン (Acetylglycitin)	458.4	H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	2 mM
アセチルゲニスチン (Acetylgenistin)	474.7	OH	H	COCH <sub>3</sub>	2 mM
アセチルダイジン (Acetyldaidzin)	458.4	H	H	COCH <sub>3</sub>	2 mM
マロニルグリシチン (Malonylglycitin)	502.4	H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> COOH	2 mM
マロニルゲニスチン (Malonylgenistin)	518.4	OH	H	COCH <sub>2</sub> COOH	2 mM
マロニルダイジン (Malonyldaidzin)	502.4	H	H	COCH <sub>2</sub> COOH	2 mM

R<sub>1</sub>~R<sub>3</sub> は、下の構造式に対応している。



アセチルグリシチン (Acetylglycitin)、アセチルゲニスチン (Acetylgenistin)、アセチルダイジン (Acetyldaidzin)、マロニルグリシチン (Malonylglycitin)、マロニルゲニスチン (Malonylgenistin)、マロニルダイジン (Malonyldaidzin) (以上フジッコ株製品、ナカライテスク社販売) をアスペルギルス フミガタス (*Asp. fumigatus*) 或いはペニシリウム マルチカラー (*Pen. multicolor*) から調製したジグリコシダーゼ酵素液とアーモンド由来の

グルコシダーゼ（シグマ社製）で以下の条件で反応させた。

各酵素を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) で希釈して、それぞれの活性を 1.88 AU/ml とし、2 mM イソフラボン (12.5  $\mu$ l)、20 mM 酢酸緩衝液 (87.5  $\mu$ l)、酵素溶液 (25  $\mu$ l) を加え 55°C で反応を行なった。反応後 1、3、6 時間で 25  $\mu$ l ずつサンプリングを行ない、分取したサンプルにメタノール 75  $\mu$ l、水 900  $\mu$ l を加えフィルター濾過 (0.2  $\mu$ m) した後水で更に 2.5 倍希釈した。この 1 ml を HPLC で解析した (HPLC 条件、カラム: ODS80TM (東ソー)、溶離液: アセトニトリルと 10% 酢酸の混合液。直線濃度勾配下で分離。))。

その結果、グルコシダーゼ（シグマ社）はどの修飾グルコシド基質もほとんど分解しなかったが両者のジグルコシダーゼはいずれの修飾グルコシドも効率よく分解し、アグリコンを遊離することが明らかになった。

#### 実施例 1 2

##### 香り成分前駆体であるオイゲニルプリメベロシドの調整

山茶花の新葉約 2kg を 100°C、10 分で熱水抽出し、抽出液をダイアイオン H P 2 0（三菱化学社製）をつめたカラムに掛け、オイゲニルプリメベシドを吸着させた。カラムをベッドボリュームの約 2 倍の脱イオン水、20%メタノールで洗浄した後、100%メタノールで吸着したオイゲニルプリメベロシドを回収した。回収されたオイゲニルプリメベロシドを含むメタノール溶液をその後濃縮し、オイゲニルプリメベロシドを結晶化させ、ガラスフィルターにて回収した。

実施例 4 で得られた粗酵素濃縮液 1 ml と 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で 5 mg/ml に調製されたオイゲニルプリメベロシド溶液 1 ml とを混合し、37°C で 24 時間でインキュベートし、香りの生成を官能試験（パネラー 10 名）により調べた。その結果、アスペルギルス ニガー 2 株及びアスペルギルス フミガタスの両粗酵素濃縮液を用いた場合の全てにおいてオイゲノール特有の香り生成することが確認された。

粗酵素濃縮液を熱処理（100°C、10 分）したものを用いた場合においては、オイゲノール特有の香りは感じられなかった。したがって、これら粗酵素抽出液にはオイゲニルプリメベロシド等の配糖体から香り成分であるアグリコンを遊離

する作用がある事が判った。

### 実施例 1 3

#### 精製酵素による pNP-プリメベロシドからの二糖遊離

実施例 6 で得られた精製酵素液 0.3 AU と前述の pNP-プリメベロシドを 37℃で 24 時間インキュベートし TLC 二糖遊離を調べた。その結果、プリメベロースと同じ位置にスポットが観察され二糖遊離が確認された。対象として行った熱処理した精製酵素液ではこのようなスポットは観察されなかった。したがって、精製された酵素は二糖配糖体から二糖を遊離する作用を有していることが判明した。

### 実施例 1 4

#### 精製酵素によるオイゲニル-プリメベロシドからの二糖遊離と香気生成

実施例 6 で得られた精製酵素液 0.3 AU と前述の pNP-プリメベロシドを 37℃で 24 時間インキュベートし TLC 二糖遊離を調べた。その結果、プリメベロースと同じ位置にスポットが観察され二糖遊離が確認された。また、反応液をガスクロマトグラフィーで分析したところオイゲニル-プリメベロシド配糖体のアグリコンであるオイゲノールの遊離が確認され、官能試験でもオイゲノールの遊離が認められた。熱失活した酵素液ではこれらは認められなかった。以上より精製された酵素はオイゲニル・プリメベロシドなど香り前駆体に作用し香気を生成することが明らかとなった。

### 実施例 1 5

#### 色素配糖体からの二糖遊離

二糖配糖体色素としてルベリトリン酸を基質として二糖遊離を調べた。ルベリトリン酸は染色用の西洋茜根粉末（田中染色店販売）の水抽出物を HP-20 カラムに吸着させ 50%メタノールで洗浄後、100%メタノールで回収しエバポレーターで蒸発乾固させ回収した。回収したルベリトリン酸をリン酸緩衝液で 5mg/ml に溶解した基質に 0.3AU の実施例 4 に示した粗酵素液または実施例 6 に示した精製酵素液を加え 37℃で 24 時間インキュベートしたのち、反応液を TLC で分析した。その結果粗酵素液及び精製酵素液で二糖プリメベロースとア

グリコンであるアリザリンの遊離が認められた。

#### 実施例 1 6

##### 他の二糖配糖体の分解

実施例 5 に示した各種の微生物由来のジグリコシダーゼに関して各種二糖配糖体の分解能を TLC を用いて調べた。その結果、ジグリコシダーゼはプリメベロシド配当体以外にナリンギンやルチン等のルチノース配糖体、ゲンチビオース配糖体、アラビノフラノシルグルコシド配糖体、アビオフラノシルグルコシド配糖体、などのプリメベロシド配糖体と類似の種々二糖配糖体に作用し、二糖を遊離し遊離アグリコンを産生することが判明した。

#### 実施例 1 7

##### 茶抽出液の香気改善

実施例 4 と 6 に示すアスペルギルス フミガタス由来の酵素液を用いて緑茶、紅茶、ウーロン茶の香気成分の増強作用を調べた。茶抽出液に酵素 1.88 AU を加え 55℃ で 24 時間インキュベーションした後、香気を増強をガスクロマトグラフィーで前述の条件で調べた。その結果、1-ヘキサノール、3-ヘキセン-1-オール、ベンズアルデヒド、リナロール、メチルサリシアナート、ゲラニオール、ベンジルアルコールなどの香気成分が増強されていることが分かった。また官能試験でも香気が増強されていることが分かった。

#### 実施例 1 8

##### 果汁の香気改善

実施例 4 と 5 に示すアスペルギルス フミガタスとペニシリウム マルチカラー由来の酵素液を用いてグレープ、オレンジ、アップル、プルーン、ネクター等の果汁に 1.88 AU の酵素を加え 37℃ で 24 時間インキュベートし香気をガスクロマトグラフィーで分析した。その結果、リナロール等の香気成分の増強が認められた。また官能試験から酵素処理した果汁の香気改善が認められた。

#### 実施例 1 9

##### ワインの香気改善

実施例 4 に示す各種粗酵素液を用いて赤ワインと白ワインに 0.5 AU の酵素を

加え 37℃で 24 時間インキュベートして香気の改善を官能試験で調べた。その結果、両方で香気の改善が認められた。

#### 実施例 2 0

実施例 4 と 5 で得られた各種粗酵素濃縮液 1 ml とブドウ果汁（市販品：果汁 100%、濃縮還元）1 ml とを混合し 37℃にて一晚（14 時間）インキュベートし、香りを調べたところ、酵素剤の代わりに酢酸緩衝液を加えたものに比べ明らかに香りが増強された。またこの作用は粗酵素濃縮液を 100℃で 10 分間加熱処理したものではありませんでした。

#### 実施例 2 1

実施例 4 で得られた粗酵素濃縮液 1 ml と市販オレンジ果汁（還元濃縮液）1 ml とを混合し 37℃で 24 時間でインキュベートし、香りの生成を官能試験により調べた。その結果、アスペルギルス ニガー 2 株及びアスペルギルス フミガタス両粗酵素濃縮液でオレンジ果汁の香りの増強効果が認められた。粗酵素濃縮液を熱処理（100℃、10 分）したものではこのような効果は認められなかった。

#### 実施例 2 2

ジグリコシダーゼによって、二糖単位での糖転移が起こるか否かを調べた。

実施例 6 の精製酵素を脱イオン水で希釈して活性を 1.0 AU/ml とし、2.5% フェネチルアルコールを含むアセトニトリル（200 ml）、10% プリメベロース含む 20 mM 酢酸緩衝液（250  $\mu$ l）、そして酵素溶液（50  $\mu$ l）を加え、55℃で反応を行った。反応を 6 時間で終了させ、ジエチルエーテル 500  $\mu$ l を加え、攪拌、遠心分離を行い、エーテル層に移行した遊離のアグリコンを除去した。水層をダイアイオン HP-20 カラムに通し、純粋を通すことで遊離のプリメベロースを除去した。樹脂に吸着した二糖配糖体をメタノールによって溶出し、濃縮乾固させた。これを脱イオン水 100  $\mu$ l に溶解し、20  $\mu$ l を TLC プレートにスポットして、反応生成物を検出した（展開溶媒は、酢酸エチル：酢酸：脱イオン水＝3：1：1。展開後、酢酸：メタノール＝1：4 液を噴霧し、105℃で 10 分間放置した）。

その結果、 $\beta$ -プリメベロシダーゼは有機溶媒中において、ジグリコシドをフェネチルアルコールに転移させ、二糖配糖体を生成することが明らかになった。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、新規な酵素である、 $\beta$ -プリメペロシド及び／又は類似する二糖配糖体を二糖単位で切断する、あるいは、修飾配糖体を分解する作用を有する酵素を微生物を給源として供給することができ、本発明の酵素組成物を用いることによって、各種食品、医薬品、医薬部外品などに広く使用できる。例えば食品などにおいてその香気、色素、生理活性成分を増強あるいは減弱することができる。

## 請求の範囲

1. 二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有する微生物由来の酵素。

2. 該二糖配糖体がβ-プリメベロシド及び／又は類似する二糖配糖体である請求項1記載の酵素。

3. 配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも1つがなされているアミノ酸配列を有し、二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有するポリペプチドからなるポリペプチド。

4. 配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドからなるポリペプチド。

5. 二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有する微生物由来のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

6. 下記(a)～(g)から選択されるポリヌクレオチドからなり、かつ、二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなるポリヌクレオチド。

(a) 配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも1つがなされているアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列表の配列番号7に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(d) 配列表の配列番号7に記載の塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも1つがなされている塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(e) 上記(a)～(d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子、



(f) 上記 (a) ~ (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチドに相同性を有するポリヌクレオチド、

(g) 上記 (a) ~ (f) の少なくともいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチドに縮重するポリヌクレオチド。

7. 配列表の配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなるポリヌクレオチド。

8. 請求項 5 から 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする組換えベクター。

9. 請求項 8 記載の組換えベクターを導入させた形質転換体。

10. 請求項 9 記載の形質転換体を栄養培地に培養し、二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有する酵素を生産せしめ、培養物より該酵素を採取することからなる二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有する酵素の製造法。

11. 微生物を栄養培地に培養し、二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有する酵素を生産せしめ、培養物より該酵素を採取することからなる二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有する酵素の製造法。

12. 微生物がアスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、リゾプス (*Rhizopus*) 属、リゾムコール (*Rhizomucor*) 属、タラロマイセス (*Talaromyces*) 属、モルチエレラ (*Mortierella*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アクチノプラネス (*Actinoplanes*) 属から選ばれる請求項 11 の製造法。

13. 栄養培地が、二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する作用を有する酵素の生産を誘導する物質を含有する請求項 10、11、または、12 記載の二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有する酵素の製造法。

14. 誘導する物質が糖類である請求項 13 記載の新規な酵素組成物の製

造。

15. 二糖配糖体を含有する材料に、当該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する作用を有する酵素を作用せしめることを特徴とする、当該材料の成分組成の改変法。

16. 二糖配糖体が香気成分前駆体又は色素成分前駆体である請求項15記載の改変法。

17. 二糖配糖体が $\beta$ -プリメベロシド及び／又は類似する二糖配糖体である請求項15記載の改変法。

18. 修飾単糖配糖体を含有する材料に、当該修飾単糖配糖体より修飾単糖を遊離する作用を有する酵素を作用せしめることを特徴とする、当該材料の成分組成の改変法。

19. 修飾単糖配糖体がアセチルグルコシド、マロニルグルコシド、メチルグルコシド、ホスホグルコシド、及び、アミドグルコシドから選ばれる1以上修飾単糖配糖体である請求項18記載の改変法。

20. 修飾単糖配糖体がイソフラボンのアセチルグルコシド、イソフラボンのマロニルグルコシド、または、それらの両方である請求項19記載の改変法。

## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> Amano Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel enzyme composition, production process therefor,  
and use thereof

<130> P-32423

<140>

<141>

<150> JP 10-294675

<151> 1998-09-30

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 1

Ala Ala Ser Ala Ser Ala Tyr Cys Ser Asn Ser Ala Gly Asn Tyr Lys  
1 5 10 15

Leu Ser Ser Ile Ala Ala  
20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 2

Leu Met Thr Pro Ala Gly Ala Asn Phe Ala Leu Met Arg His Thr Ile  
1 5 10 15

Gly Ala Ser Asp Leu Ser  
20

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>

<221> modified\_base

<222> (14)  
<223> i

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (20)  
<223> i

<400> 3  
acgaattcaa ywsngcnggn aaytayaa

28

<210> 4  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (17)  
<223> i

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (23)  
<223> i

<400> 4  
cggaattcta ytgysnaay wsngcngg

28

<210> 5  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (17)  
<223> i

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (23)  
<223> i

<400> 5  
tcaagcttgc raarttngcn ccngcngg

28

<210> 6  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (11)  
<223> i

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (17)  
<223> i

<400> 6  
agaagcttgc nccdatngtr tgnckcat

28

<210> 7  
<211> 1401  
<212> DNA  
<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 7  
gccgcctctg cttcggctta ctgttccaac tcggccggca actacaagct gtcctccatc 60  
gcagctccgg ttcaaggggc cggaaacccc ggctcggaaat cgacctggca attgaccgtt 120  
gacgacactt cgtccgggtca caaacagacg atagttgggt tcggtgctgc tgtcactgat 180  
gccacgggtca cctcgttcaa cactttgtcc gcctccgtgc tgcaagactt gctcaataaa 240  
ctgatgacac ctgccggggc gaactttgct ttgatgacgac atactattgg ggcttcggat 300  
ctgtccgggtg acccagccta cacgtacgat gacaatggtg ggaaagcggg tccgtcactg 360  
tcgggattca acctggggga ccgcggaacg gctatggcca agatgttggc aacaatgaag 420  
tctctgcagc ccaacctcaa gatcctcggc tctccctgga gtgcaccagg atggatgaag 480  
ctgaacgggg tccttgatgg caatacgaac aacaacaact tgaacgatgg atacctaacc 540  
agtgggggaa ccggtagtagc ggggtatgcc agtcaattcg cgcagtactt tgtcaagtag 600  
attcaggcct ataagaatct cgggtgtcac gtcgacgcga ttaccatcca gaacgagccg 660  
ctgttcagct cagcgggcta tcccaccatg tatgtctacg attatgagtc ggcacagctg 720  
atccagaact acatcgcccc cgctcttgcc agcgcggggc tagatacggg aatctgggct 780  
tatgaccaca acacagatgt cccgtcgtac ccccagactg tccttaacca ggccgggtcag 840

tacgtcaagt cgggtggcctg gcactgctac gctcccaacg tcgactggac cgtgctcagc 900  
 cagttccaca acacaaaccc tggagtgaag caatatatga ccgagtgtg gactccagca 960  
 tctggcgcat ggcatcaggc ggcggacttc accatgggtc cctgcagaa ctgggcctcg 1020  
 ggagtggcag catggactct gggaaccaac gctcaggatg gtccgcatct gtccactggc 1080  
 ggctgcgca catgtcaagg cttggtgacc atcaacaacg gaggatacac gctcaacacc 1140  
 gcatactaca tgatggcgca attcagcaag ttcattgccg ctggtgcgat tgtgtcaat 1200  
 ggcagtggca gctacacgta ctctggcgga ggcggtatcc agtccgtggc ttccttgaat 1260  
 cccgatggaa cccgcactgt ggttattgaa aacacttttg gcaatgatgt ctatgtgact 1320  
 gtcactatga agagcgggca gaagtggagt gggaacgccc ctagccaatc cgtgactacc 1380  
 tgggttcttc catctgcttg a 1401

<210> 8  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 8  
 Ala Ala Ser Ala Ser Ala Tyr Cys Ser Asn Ser Ala Gly Asn Tyr Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Ile Ala Ala Pro Val Gln Gly Ala Gly Asn Pro Gly Ser  
 20 25 30  
 Glu Ser Thr Trp Gln Leu Thr Val Asp Asp Thr Ser Ser Gly His Lys  
 35 40 45  
 Gln Thr Ile Val Gly Phe Gly Ala Ala Val Thr Asp Ala Thr Val Thr  
 50 55 60  
 Ser Phe Asn Thr Leu Ser Ala Ser Val Leu Gln Asp Leu Leu Asn Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Met Thr Pro Ala Gly Ala Asn Phe Ala Leu Met Arg His Thr Ile  
 85 90 95  
 Gly Ala Ser Asp Leu Ser Gly Asp Pro Ala Tyr Thr Tyr Asp Asp Asn  
 100 105 110  
 Gly Gly Lys Ala Asp Pro Ser Leu Ser Gly Phe Asn Leu Gly Asp Arg  
 115 120 125  
 Gly Thr Ala Met Ala Lys Met Leu Ala Thr Met Lys Ser Leu Gln Pro  
 130 135 140  
 Asn Leu Lys Ile Leu Gly Ser Pro Trp Ser Ala Pro Gly Trp Met Lys  
 145 150 155 160

4/11

Leu Asn Gly Val Leu Asp Gly Asn Thr Asn Asn Asn Asn Leu Asn Asp  
 165 170 175  
 Gly Tyr Leu Thr Ser Gly Gly Thr Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Ser Gln  
 180 185 190  
 Phe Ala Gln Tyr Phe Val Lys Tyr Ile Gln Ala Tyr Lys Asn Leu Gly  
 195 200 205  
 Ala His Val Asp Ala Ile Thr Ile Gln Asn Glu Pro Leu Phe Ser Ser  
 210 215 220  
 Ala Gly Tyr Pro Thr Met Tyr Val Tyr Asp Tyr Glu Ser Ala Gln Leu  
 225 230 235 240  
 Ile Gln Asn Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Ala Ser Ala Gly Leu Asp Thr  
 245 250 255  
 Glu Ile Trp Ala Tyr Asp His Asn Thr Asp Val Pro Ser Tyr Pro Gln  
 260 265 270  
 Thr Val Leu Asn Gln Ala Gly Gln Tyr Val Lys Ser Val Ala Trp His  
 275 280 285  
 Cys Tyr Ala Pro Asn Val Asp Trp Thr Val Leu Ser Gln Phe His Asn  
 290 295 300  
 Thr Asn Pro Gly Val Lys Gln Tyr Met Thr Glu Cys Trp Thr Pro Ala  
 305 310 315 320  
 Ser Gly Ala Trp His Gln Ala Ala Asp Phe Thr Met Gly Pro Leu Gln  
 325 330 335  
 Asn Trp Ala Ser Gly Val Ala Ala Trp Thr Leu Gly Thr Asn Ala Gln  
 340 345 350  
 Asp Gly Pro His Leu Ser Thr Gly Gly Cys Ala Thr Cys Gln Gly Leu  
 355 360 365  
 Val Thr Ile Asn Asn Gly Gly Tyr Thr Leu Asn Thr Ala Tyr Tyr Met  
 370 375 380  
 Met Ala Gln Phe Ser Lys Phe Met Pro Pro Gly Ala Ile Val Leu Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gln Ser Val  
 405 410 415  
 Ala Ser Leu Asn Pro Asp Gly Thr Arg Thr Val Val Ile Glu Asn Thr  
 420 425 430  
 Phe Gly Asn Asp Val Tyr Val Thr Val Thr Met Lys Ser Gly Gln Lys  
 435 440 445

Trp Ser Gly Asn Ala Pro Ser Gln Ser Val Thr Thr Trp Val Leu Pro  
 450 455 460

Ser Ala  
 465

<210> 9  
 <211> 1647  
 <212> DNA  
 <213> *Aspergillus fumigatus*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (54)..(1520)

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (120)..(1520)

<400> 9  
 ggcgacacca gaaagcaacc aagagcacga cacggactta tttctctttg aca atg 56  
 Met

cgt ata tct gtc ggt gct ctg ctt ggc ttg aca gcc ctg agt cat gcc 104  
 Arg Ile Ser Val Gly Ala Leu Leu Gly Leu Thr Ala Leu Ser His Ala  
 -20 -15 -10

aca aca gag aaa cga gcc gcc tct gct tcg gct tac tgt tcc aac tcg 152  
 Thr Thr Glu Lys Arg Ala Ala Ser Ala Ser Ala Tyr Cys Ser Asn Ser  
 -5 -1 1 5 10

gcc ggc aac tac aag ctg tcc tcc atc gca gct ccg gtt caa ggg gcc 200  
 Ala Gly Asn Tyr Lys Leu Ser Ser Ile Ala Ala Pro Val Gln Gly Ala  
 15 20 25

gga aac ccc ggc tcg gaa tcg acc tgg caa ttg acc gtt gac gac act 248  
 Gly Asn Pro Gly Ser Glu Ser Thr Trp Gln Leu Thr Val Asp Asp Thr  
 30 35 40

tcg tcc ggt cac aaa cag acg ata gtt ggg ttc ggt gct gct gtc act 296  
 Ser Ser Gly His Lys Gln Thr Ile Val Gly Phe Gly Ala Ala Val Thr  
 45 50 55

gat gcc acg gtc acc tcg ttc aac act ttg tcc gcc tcc gtg ctg caa 344  
 Asp Ala Thr Val Thr Ser Phe Asn Thr Leu Ser Ala Ser Val Leu Gln  
 60 65 70 75

gac ttg ctc aat aaa ctg atg aca cct gcc ggg gcg aac ttt gct ttg 392  
 Asp Leu Leu Asn Lys Leu Met Thr Pro Ala Gly Ala Asn Phe Ala Leu  
 80 85 90

atg cga cat act att ggg gct tcg gat ctg tcc ggt gac cca gcc tac 440  
 Met Arg His Thr Ile Gly Ala Ser Asp Leu Ser Gly Asp Pro Ala Tyr  
 95 100 105



acg tac gat gac aat ggt ggg aaa gcg gat ccg tca ctg tcg gga ttc Thr Tyr Asp Asp Asn Gly Gly Lys Ala Asp Pro Ser Leu Ser Gly Phe 110 115 120	488
aac ctg ggg gac cgc gga acg gct atg gcc aag atg ttg gca aca atg Asn Leu Gly Asp Arg Gly Thr Ala Met Ala Lys Met Leu Ala Thr Met 125 130 135	536
aag tct ctg cag ccc aac ctc aag atc ctc ggc tct ccc tgg agt gca Lys Ser Leu Gln Pro Asn Leu Lys Ile Leu Gly Ser Pro Trp Ser Ala 140 145 150 155	584
cca gga tgg atg aag ctg aac ggg gtc ctt gat ggc aat acg aac aac Pro Gly Trp Met Lys Leu Asn Gly Val Leu Asp Gly Asn Thr Asn Asn 160 165 170	632
aac aac ttg aac gat gga tac cta acc agt ggg gga acc ggt agt acg Asn Asn Leu Asn Asp Gly Tyr Leu Thr Ser Gly Gly Thr Gly Ser Thr 175 180 185	680
ggg tat gcc agt caa ttc gcg cag tac ttt gtc aag tac att cag gcc Gly Tyr Ala Ser Gln Phe Ala Gln Tyr Phe Val Lys Tyr Ile Gln Ala 190 195 200	728
tat aag aat ctc ggt gct cac gtc gac gcg att acc atc cag aac gag Tyr Lys Asn Leu Gly Ala His Val Asp Ala Ile Thr Ile Gln Asn Glu 205 210 215	776
ccg ctg ttc agc tca gcg ggc tat ccc acc atg tat gtc tac gat tat Pro Leu Phe Ser Ser Ala Gly Tyr Pro Thr Met Tyr Val Tyr Asp Tyr 220 225 230 235	824
gag tcg gca cag ctg atc cag aac tac atc ggc ccc gct ctt gcc agc Glu Ser Ala Gln Leu Ile Gln Asn Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Ala Ser 240 245 250	872
gcg ggg cta gat acg gaa atc tgg gct tat gac cac aac aca gat gtc Ala Gly Leu Asp Thr Glu Ile Trp Ala Tyr Asp His Asn Thr Asp Val 255 260 265	920
ccg tcg tac ccc cag act gtc ctt aac cag gcc ggt cag tac gtc aag Pro Ser Tyr Pro Gln Thr Val Leu Asn Gln Ala Gly Gln Tyr Val Lys 270 275 280	968
tcg gtg gcc tgg cac tgc tac gct ccc aac gtc gac tgg acc gtg ctc Ser Val Ala Trp His Cys Tyr Ala Pro Asn Val Asp Trp Thr Val Leu 285 290 295	1016
agc cag ttc cac aac aca aac cct gga gtg aag caa tat atg acc gag Ser Gln Phe His Asn Thr Asn Pro Gly Val Lys Gln Tyr Met Thr Glu 300 305 310 315	1064
tgc tgg act cca gca tct ggc gca tgg cat cag gcg gcg gac ttc acc Cys Trp Thr Pro Ala Ser Gly Ala Trp His Gln Ala Ala Asp Phe Thr 320 325 330	1112

atg ggt ccc ctg cag aac tgg gcc tcg gga gtg gca gca tgg act ctg 1160  
 Met Gly Pro Leu Gln Asn Trp Ala Ser Gly Val Ala Ala Trp Thr Leu  
 335 340 345

gga acc aac gct cag gat ggt ccg cat ctg tcc act ggc ggc tgc gcg 1208  
 Gly Thr Asn Ala Gln Asp Gly Pro His Leu Ser Thr Gly Gly Cys Ala  
 350 355 360

aca tgt caa ggc ttg gtg acc atc aac aac gga gga tac acg ctc aac 1256  
 Thr Cys Gln Gly Leu Val Thr Ile Asn Asn Gly Gly Tyr Thr Leu Asn  
 365 370 375

acc gca tac tac atg atg gcg caa ttc agc aag ttc atg ccg cct ggt 1304  
 Thr Ala Tyr Tyr Met Met Ala Gln Phe Ser Lys Phe Met Pro Pro Gly  
 380 385 390 395

gcg att gtg ctc aat ggc agt ggc agc tac acg tac tct ggc gga ggc 1352  
 Ala Ile Val Leu Asn Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Ser Gly Gly Gly  
 400 405 410

ggt atc cag tcc gtg gct tcc ttg aat ccc gat gga acc cgc act gtg 1400  
 Gly Ile Gln Ser Val Ala Ser Leu Asn Pro Asp Gly Thr Arg Thr Val  
 415 420 425

gtt att gaa aac act ttt ggc aat gat gtc tat gtg act gtc act atg 1448  
 Val Ile Glu Asn Thr Phe Gly Asn Asp Val Tyr Val Thr Val Thr Met  
 430 435 440

aag agc ggg cag aag tgg agt ggg aac gcc cct agc caa tcc gtg act 1496  
 Lys Ser Gly Gln Lys Trp Ser Gly Asn Ala Pro Ser Gln Ser Val Thr  
 445 450 455

acc tgg gtt ctt cca tct gct tga aaagagtgtg gtttcagatg gttagatatg 1550  
 Thr Trp Val Leu Pro Ser Ala  
 460 465

tattgaagag tagcgcttgg agacatcaat agcctttttc taattacatg tcgtgcagct 1610

tccaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aactcga 1647

<210> 10  
 <211> 488  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus fumigatus

<400> 10  
 Met Arg Ile Ser Val Gly Ala Leu Leu Gly Leu Thr Ala Leu Ser His  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Thr Glu Lys Arg Ala Ala Ser Ala Ser Ala Tyr Cys Ser Asn  
 20 25 30  
 Ser Ala Gly Asn Tyr Lys Leu Ser Ser Ile Ala Ala Pro Val Gln Gly  
 35 40 45

Ala Gly Asn Pro Gly Ser Glu Ser Thr Trp Gln Leu Thr Val Asp Asp  
 50 55 60  
 Thr Ser Ser Gly His Lys Gln Thr Ile Val Gly Phe Gly Ala Ala Val  
 65 70 75 80  
 Thr Asp Ala Thr Val Thr Ser Phe Asn Thr Leu Ser Ala Ser Val Leu  
 85 90 95  
 Gln Asp Leu Leu Asn Lys Leu Met Thr Pro Ala Gly Ala Asn Phe Ala  
 100 105 110  
 Leu Met Arg His Thr Ile Gly Ala Ser Asp Leu Ser Gly Asp Pro Ala  
 115 120 125  
 Tyr Thr Tyr Asp Asp Asn Gly Gly Lys Ala Asp Pro Ser Leu Ser Gly  
 130 135 140  
 Phe Asn Leu Gly Asp Arg Gly Thr Ala Met Ala Lys Met Leu Ala Thr  
 145 150 155 160  
 Met Lys Ser Leu Gln Pro Asn Leu Lys Ile Leu Gly Ser Pro Trp Ser  
 165 170 175  
 Ala Pro Gly Trp Met Lys Leu Asn Gly Val Leu Asp Gly Asn Thr Asn  
 180 185 190  
 Asn Asn Asn Leu Asn Asp Gly Tyr Leu Thr Ser Gly Gly Thr Gly Ser  
 195 200 205  
 Thr Gly Tyr Ala Ser Gln Phe Ala Gln Tyr Phe Val Lys Tyr Ile Gln  
 210 215 220  
 Ala Tyr Lys Asn Leu Gly Ala His Val Asp Ala Ile Thr Ile Gln Asn  
 225 230 235 240  
 Glu Pro Leu Phe Ser Ser Ala Gly Tyr Pro Thr Met Tyr Val Tyr Asp  
 245 250 255  
 Tyr Glu Ser Ala Gln Leu Ile Gln Asn Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Ala  
 260 265 270  
 Ser Ala Gly Leu Asp Thr Glu Ile Trp Ala Tyr Asp His Asn Thr Asp  
 275 280 285  
 Val Pro Ser Tyr Pro Gln Thr Val Leu Asn Gln Ala Gly Gln Tyr Val  
 290 295 300  
 Lys Ser Val Ala Trp His Cys Tyr Ala Pro Asn Val Asp Trp Thr Val  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Gln Phe His Asn Thr Asn Pro Gly Val Lys Gln Tyr Met Thr  
 325 330 335  
 Glu Cys Trp Thr Pro Ala Ser Gly Ala Trp His Gln Ala Ala Asp Phe  
 340 345 350

Thr Met Gly Pro Leu Gln Asn Trp Ala Ser Gly Val Ala Ala Trp Thr  
           355                          360                          365  
 Leu Gly Thr Asn Ala Gln Asp Gly Pro His Leu Ser Thr Gly Gly Cys  
       370                          375                          380  
 Ala Thr Cys Gln Gly Leu Val Thr Ile Asn Asn Gly Gly Tyr Thr Leu  
 385                          390                          395                          400  
 Asn Thr Ala Tyr Tyr Met Met Ala Gln Phe Ser Lys Phe Met Pro Pro  
                           405                          410                          415  
 Gly Ala Ile Val Leu Asn Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Ser Gly Gly  
                           420                          425                          430  
 Gly Gly Ile Gln Ser Val Ala Ser Leu Asn Pro Asp Gly Thr Arg Thr  
                           435                          440                          445  
 Val Val Ile Glu Asn Thr Phe Gly Asn Asp Val Tyr Val Thr Val Thr  
       450                          455                          460  
 Met Lys Ser Gly Gln Lys Trp Ser Gly Asn Ala Pro Ser Gln Ser Val  
 465                          470                          475                          480  
 Thr Thr Trp Val Leu Pro Ser Ala  
                           485

<210> 11  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11  
 gggcctgcag gaattcatgg tggt

24

<210> 12  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12  
 cgagccgggg tttccgtccg caggcgttgc

30

<210> 13  
 <211> 30  
 <212> DNA

10/11

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

gcaacgcctg cggacggaaa ccccggtcg

30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

gcgcaagctt ggaagctgca cgacatgtaa

30

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

gcgcaagctt tgaagggtgg agagt

25

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

gcgccctgca ggtctagaat tcctagtgg t

31

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05346

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>6</sup> C12N 15/56, C12N 9/24, C12P 19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>6</sup> C12N 15/56, C12N 9/24, C12P 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 8-140675, A (Mitsui Norin K.K.), 04 June, 1996 (04.06.96) (Family: none)	1, 2, 15-17
X	Yasuyuki Ijima et al., "Characterization of $\beta$ -primeverosidase, being concerned with alcoholic aroma formation in tea leaves to be processed into black tea, and preliminary observations on its substrate", J. Agric. Food Chem. (May, 1998), Vol. 46, No. 5, pages 1712-1718	1, 2, 15-17
A	Yin Kiong Hoh et al., "Properties of $\beta$ -glucosidase purified from <i>Aspergillus niger</i> mutants USDB 0827 and USDB 0828", Applied Microbiology Biotechnology (1992), Vol. 37, No. 5, pages 590-593	1-20
A	Wolfgang Hosel "Reinigung und charakterisierung zweier $\beta$ -glykosidasen mit bevorzugter spezifität für biochanin-A-7- $\beta$ -apiosylglucosid aus <i>Cicer arietinum</i> L", Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. (1976), Vol. 357, No. 12, pages 1673-1681	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing  
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 November, 1999 (18.11.99)Date of mailing of the international search report  
30 November, 1999 (30.11.99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05346

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions as set forth in claims 1 to 17 relate to an enzyme having an activity of liberating saccharides in disaccharide units from disaccharide glycosides, a process for producing the same and utilization of the same, while inventions as set forth in claims 18 to 20 may involve an enzyme different from the above-described enzyme. Such being the case, these two groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions being so linked as to form a single general inventive step.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05346

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N 15/56, C12N 9/24, C12P 19/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N 15/56, C12N 9/24, C12P 19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 8-140675, A (三井農林株式会社) 4.6月. 1996 (04.06.96) (ファミリーなし)	1, 2, 15-17
X	Yasuyuki Ijima et al. "Characterization of $\beta$ -primeverosidase, being concerned with alcoholic aroma formation in tea leaves to be processed into black tea, and preliminary observations on its substrate", J. Agric. Food Chem. (May, 1998), Vol. 46, No. 5, p. 1712-1718	1, 2, 15-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.11.99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

4 N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式 PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Yin Kiong Hoh et al. "Properties of $\beta$ -glucosidase purified from <i>Aspergillus niger</i> mutants USDB 0827 and USDB 0828", <i>Applied Microbiology Biotechnology</i> (1992) , Vol. 37, No. 5 p. 590-593	1 - 2 0
A	Wolfgang Hosel "Reinigung und charakterisierung zweier $\beta$ -glykosidasen mit bevorzugter spezifitat fur biochanin-A-7- $\beta$ -apiosylglucosid aus <i>Cicer arietinum</i> L", <i>Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.</i> (1976) , Vol. 357, No. 12, p. 1673-1681	1 - 2 0

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-17は、二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する活性を有する酵素、その製造法、及びその用途に関するものであり、請求の範囲18-20は、上記酵素とは違う酵素をも含み得ることから、これら2つの発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)